

Inventaris Wob-verzoek W23-03										
nr.	document NTS 202215973	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 01-04-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij de aanvraag				x	x		x	z	
3	Bijlagen dierproeven bij de aanvraag				x			x	x	
4	NTS bij de aanvraag				x				x	
5	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 06-04-2022				x				x	
6	DEC-advies, d.d. 03-05-2022				x		x		x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x	x		x	x	
8	Bijlagen dierproeven na DEC advies				x			x	x	
9	NTS na DEC advies				x			x	x	
10	AdviesnotaCCD, d.d. 10-05-2022 met opmerkingen				x	x	x		x	x
11	AdviesNotaCCD, d.d. 13-05-2022				x	x	x		x	x
12	Email CCD aan DEC, vraag over DEC advies, d.d. 13-05-2022				x		x		x	
13	Email DEC aan CCD, antwoord op vraag, d.d. 19-05-2022				x		x		x	
14	Email intern beraad, d.d. 20-05-2022				x		x		x	
15	Email intern beraad, d.d. 23-05-2022				x		x			
16	Email intern beraad, d.d. 23-05-2022				x		x			x
17	E-mail CDD aan vergunninghouder, vragen over aanvraag projectvoorstel, d.d. 25-05-2022				x		x		x	
18	Reactie op vragen CCD				x				x	
19	Projectvoorstel na vragen CCD				x				x	
20	Bijlagen dierproeven na vragen CCD NOG SPLITSEN!)				x			x		
21	NTS na vragen CCD en definitieve versie			x						
22	AdviesNotaCCD, d.d. 30-05-2022				x	x	x		x	x
23	Beschikking concept, d.d. 30-05-2022				x		x		x	
24	Beschikking definitief, d.d. 31-05-2022				x		x		x	
25	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over aanvraag projectvergunning, d.d. 03-06-2022				x		x		x	

- Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens
- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
 - Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
 - Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
 - Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	[X] Ja > Vul uw deelnemernummer in [] Nee > U kunt geen aanvraag doen	5.1 lid2h	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	5.1 lid2h dr. 5.1 lid2e 5.1 lid2h	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e onderzoeker 5.1 lid2e	[] Dhr. [] Mw.
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e onderzoeker 5.1 lid2e	[] Dhr. [] Mw.
1.6	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon	(Titel) naam en voorletters		[] Dhr. [] Mw.

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
 Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
 Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
 Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
 Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

- Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.3 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
 Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
 Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.4 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
 Nee > Ga verder met vraag 3
 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en Startdatum
einddatum van het project?
1-7-2022
30-6-2026
- 3.2 Wat is de titel van het project?
Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL)
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
Verbeteren van de vitaliteit van palinglarven

3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC Postadres E-mailadres	5.1 lid2h 5.1 lid2h
-----	--	--------------------------------------	-------------------------------

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1757
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.	<input type="checkbox"/> Wijziging € <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso <input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel inclusief DAP <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing <input type="checkbox"/> Melding Machtiging <input checked="" type="checkbox"/> inkooporder 5.1 lid2h 1528993

6 Ondertekening

6.1	Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> • dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn. • dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
-----	--	---

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	dr. 5.1 lid2e
Functie	gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h 5.1 lid2h
Datum	1-4-2022
Handtekening	



Centrale Commissie Dierproeven

Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL) |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
<input checked="" type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training
<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
<input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |
|-----|---|---|

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Aanleiding

Aanleiding voor deze aanvraag is de sterke achteruitgang van de Europese aal (of paling), wat de kwekers er toe heeft aangezet een duurzaam alternatief te willen ontwikkelen voor de onttrekking van glasaal (pootgoed) uit de natuurlijke populatie voor opkweek. Het sluiten van de productiecycclus van de paling kan zowel een duurzame aquacultuur realiseren als bijdragen aan een duurzaam natuurlijk bestand door het verlagen van de visserijdruk en mogelijk door uitzet. Het onderzoek naar vermeerdering van de aal onder geconditioneerde omstandigheden is in 2015 uitgezet door [5.1 lid2h](#)

[5.1 lid2h](#) produceert inmiddels drie keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dit project heeft het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Migrante soorten die net als de paling van belang zijn voor consumptie, maar waarbij het scheppen van kweekmogelijkheden ook van belang is voor instandhouding van de natuurlijke populaties.

Wat is er al bekend?

De Europese aal migreert éénmalig 6.000 km naar de Sargassozee om te paaien en vervolgens te sterven. Dit leiden we af uit twee feiten: in het najaar trekken puberende alen richting zee, en in het voorjaar zijn twee dagen oude larven aangetroffen in de Sargassozee (Schmidt, 1912, 1923). Op het moment dat ze in de zee verdwijnen zijn ze nog in een prepuberale staat en hebben de vrouwtjes een relatieve gonadenmassa (GSI) van max. 2%. Zo'n 6 maanden later in het voorjaar als ze volledig zijn afgerijpt in de Sargasso zee kan die GSI zijn opgelopen tot zo'n 60% (Palstra et al., 2005). Migrerende alen eten niet meer en vertrouwen dus volledig op hun energievoorraden voor succesvolle migratie en maturatie (afrijping). Na de paai zijn meer dan 70% van de energievoorraden uitgeput waarmee wordt aangenomen dat de alen sterven.

Er is echter nog nooit een afgerijpte paling gevonden in de Sargassozee, alle bestaande kennis van seksuele maturatie en reproductie komt uit het lab. Onderzoeksinspanningen hebben geregeld geleid tot larvenproductie maar het vóórkomen van larvale abnormaliteiten en sterften zijn hoog. Dit geldt ook nog altijd voor de Japanse aal waarvoor reeds een vijfde generatie is verkregen (Tsukamoto, 2019). Wel hebben de resultaten van de Japanse onderzoekers laten zien dat glasaal kan worden verkregen en de cyclus kan worden gesloten. Voor de Europese aal zullen dan eerst reproductietechnologieën moeten worden ontwikkeld voor de productie van vitale palinglarven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet.

Gedurende de eerst vijf jaren [5.1 lid2h](#) hebben we een manier ontwikkeld om van pootaaltjes in 1,5 jaar goede ouderdieren te maken via feminisering, de juiste voeding en gesimuleerde migratie (Mes et al., 2016): Een aanzienlijke generatieduur verkorting ten opzichte van wilde aal die tenminste 7 tot wel meer dan 50 jaar oud zijn. Deze gefeminiseerde alen, maar ook wilde schieralen, zijn succesvol tot afrijping gebracht via het gangbare protocol, en na innovaties in dat protocol zoals het gebruik van steroid-implantaten en aal-specifieke recombinante gonadotropinen. Methodiek is ontwikkeld om in vitro oocyt maturatie te volgen en ovulatie-inducerende hormonen en doses te testen, als ook om eikwaliteit te kunnen beoordelen. Spontane afrijping is voor het eerst

geobserveerd en wordt gemonitord (Palstra et al., 2020). Inmiddels worden drie keer per week larvenbatches geproduceerd die tot 25 dagen in leven blijven (Jéhannet et al., 2021). Parallel aan het toegenomen succes in larvenproductie wordt gewerkt aan het design van een hatchery-nursery om de juiste larvale condities te kunnen testen.

Door de ontwikkelde protocollen en de constante verbetering van die protocollen zijn we in staat om gecontroleerd larven te produceren met wilde glasaal als uitgangsmateriaal. Zo produceren we inmiddels twee keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dat kan worden geconcludeerd uit eibatches waarvan een groot deel zinkt of die niet leiden tot embryonale ontwikkeling; vertraging in het uitkomen van de eieren; sensitiviteit voor pathogenen; een diversiteit aan abnormale ontwikkelingen, en hoge mortaliteit, met name in de eerste week als larven van passief verticaal hangend in de waterkolom over moeten schakelen naar actief zwemmen en bijzonder gevoelig zijn voor beschadiging. Door deze lage vitaliteit krijgen we de larven nog niet tot exogene voeding en daarmee kunnen we nog niet de glasaal produceren waarmee we de productiecycclus kunnen sluiten. Om dat te bereiken heeft dit project het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven.

Referenties

- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Heinsbroek, L.T.N., Kruijt, L., Dirks, R.P., Swinkels, W., Komen, H. (2021) What goes wrong during early development of artificially reproduced European eel *Anguilla anguilla*? Clues from the larval transcriptome and gene expression patterns. *Animals* 11, 1710.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367–372.
- Palstra AP, Cohen EGH, Niemantsverdriet PRW, Van Ginneken VJT, Van den Thillart GEEJM (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1–4): 533–547.
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S. (2020) First observation of a spontaneously matured female European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific Reports* 10: 2339
- Schmidt, J. (1912) The reproduction and spawning places of the fresh-water eel (*Anguilla vulgaris*). *Nature* 89: 633-636.
- Schmidt, J. (1923) Breeding places and migration of the eel. *Nature* 111: 51-54.
- Tsukamoto K. (2019) Update Nihon University progression. 4th EELRIC workshop, Berlin, October 2019.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives
-

Onmiddellijk doel

Dit project heeft het specifieke doel om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, larven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. Het halen van dit doel is een fundamenteel biologische uitdaging die een integrale aanpak van expertises vereist om het oplossen van deze specifieke bottleneck in het sluiten van de productiecycclus mogelijk te maken.

Uiteindelijk doel

Het uiteindelijke doel is om een succesvolle kunstmatige reproductie van paling te bewerkstelligen dat zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in Nederlandse aquacultuurbedrijven. Het sluiten van de productiecycclus kan de aquacultuur voorzien van pootgoed en loskoppelen van de visserij op glasaal, om zodoende zowel een duurzaam natuurlijk bestand als duurzame aquacultuur te realiseren. De inspanningen van Japanse onderzoekers die de productiecycclus van de Japanse aal hebben

gesloten en inmiddels een vijfde generatie hebben voortgebracht, kunnen de progressie voor de Europese aal accelereren.

Wat gaat dit project opleveren?

Vitale larven kunnen tot voeden worden aangezet en opgroeien tot glasaal. Met het herhalen van het ontwikkelde protocol om van glasaal goede ouderdieren te maken zal de cyclus kunnen worden gesloten. Dat kan vervolgens concreet leiden tot bedrijfsmatige productie van glasaal in de Nederlandse aquacultuurbedrijven waarmee niet alleen een duurzaam voortbestaan van de sector wordt geborgd maar waarmee ook groei van de sector mogelijk wordt gemaakt. De glasaalvisserij, en algehele bevissing van de wilde populatie, wordt daarmee overbodig zodat de druk op de natuurlijke populatie wordt verminderd. De mogelijkheid om kunstmatig geproduceerde glasaal te gebruiken voor uitzetting kan onderzocht worden.

Succesvolle kunstmatige reproductie is een wereldwijde primeur. Het onderzoek sluit aan op een rijke historie en aanzienlijke track record binnen het palingreproductie onderzoek. De nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën en de gegenereerde kennis komt het visreproductie onderzoek naar andere, voor de aquacultuur belangrijke, maar lastig te reproduceren, iconische soorten als steur en tonijn, ten goede. Aangezien de problematiek voor het reproduceren van vissen in gevangenschap generiek is en vaak alleen verschilt in de levensfase waarin de onderdrukking van de reproductie plaats heeft (voor paling al voor aanvang van de puberteit) wordt verwacht dat de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën breder inzetbaar zijn dan voor paling alleen.

Subdoelen

Het beschreven doel wordt bereikt door zowel eikwaliteit als larvenvitaliteit te verbeteren. De eikwaliteit zal worden verbeterd:

- door verfijning in conditionering van de ouderdieren;
- door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën;
- door het op grote schaal kunnen fenotyperen van de eikwaliteit.

De larven vitaliteit zal worden verbeterd :

- door aanpassingen in hatchery en nursery;
- door het achterhalen van de fysiologische mechanismen die van belang zijn voor larvale ontwikkeling en overleving;
- door het kunnen fenotyperen van de larvale kwaliteit.

Succesvolle larvale voedingsproeven zullen vervolgens aantonen dat bovenstaande subdoelen zijn bereikt. Het verbeteren van eikwaliteit en larvenkwaliteit zou zich moeten vertalen naar grote aantallen etende larven van goede kwaliteit. Daarmee zijn succesvolle voedingsproeven een validatie van de geboekte progressie.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We zijn nu in staat om met een serie houderij technieken (feminisatie, broodstock voeding, gesimuleerde migratie) van wilde glasaal goede vrouwelijke ouderdieren te maken in slechts 1.5 jaar, tenminste een 5x generatieduurverkorting. Zowel deze ouderdieren als wilde ouderdieren kunnen we nu sneller tot afrijping brengen en we hebben methodiek ontwikkeld om tot betere resultaten te komen. Inmiddels betaalt zich dat uit en kunnen we drie keer per week larvenbatches produceren, tot wel 100.000 larven per batch die tot 25 dagen in leven blijven. Ook de overleving hebben we weten te verbeteren door gebruik van antibiotica. Het traject van glasaal tot larve hebben we dus rond. Larvenkwaliteit voldoet echter nog niet om de laatste stap naar glasaalproductie te kunnen zetten en is de uitdaging voor nieuw onderzoek. Met de afgelopen 5 jaar aan opgebouwde kennis hebben we de juiste doelen voor dit project weten te stellen om de larvenvitaliteit te verbeteren en succesvol voedingsproeven te kunnen doen.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?[] No[X] Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

Aal is in 2007 in Appendix II in de CITES-lijst geplaatst. CITES is een internationaal verdrag tussen landen die de handel in diersoorten en planten beperkt. Appendix II houdt in dat de soort "niet noodzakelijkerwijs wordt bedreigd, maar dat het verstandig wordt geacht de handel te reguleren opdat die handel geen bedreiging vormt voor de soort en van daaruit maatregelen worden genomen die de handel in aal beperkt". Hierdoor mag er bijvoorbeeld geen export van Europese aal uit de EU zijn.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Technologisch

De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk en worden nieuwe aquacultuur sectoren leven ingeblazen. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.

Economisch

Succesvolle kunstmatige reproductie (en dus productie van glasaal) levert direct voordeel aan de **5.1 lid1c** kweekbedrijven **5.1 lid1c** doordat zij dan kunnen bijdragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege de schaarste hoge prijzen kent. Dit neemt een belangrijke maatschappelijke zorg weg en stelt het bestaansrecht van de ondernemingen veilig. De partners verwachten dat de resultaten uit het onderzoek zullen bijdragen aan een positievere beeldvorming op het gebied van consumptie van paling in Nederland. Er is een enorme markt in Nederland voor betaalbare palingproducten. Voor elke 1000 ton productie van paling komen er 100-150 arbeidsplaatsen bij. Door de beschikbaarheid van geproduceerde glasaal kan de productie aan de vraag worden aangepast.

Sociaal

Het publiek is gebaat bij behoud van de paling als gewilde consumptievis, de rijke cultuur en tradities die dat met zich meebrengt en de banen die gegenereerd zullen worden. Maar het publiek is ook gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid.

Ecologisch

Een gesloten productiecycclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluizen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

5.1 lid1c, 5.1 lid2h

Tenslotte kunnen ook de proefdieren; glasaal en schieraal uit de natuur en voedende larven uit eigen kweek, worden beschouwd als stakeholders binnen dit project. De paling zelf heeft baat bij het verlagen van de visserijdruk op de natuurlijke populatie, het verbeteren van dierenwelzijn en het verhogen van de vitaliteit van de larven.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Stimulering van afrijping

Wilde glasaal is nog altijd het uitgangsmateriaal voor een gesimuleerde levenscyclus waarin we in 1,5 jaar goede moeders kunnen maken via feminisering (Chai et al., 2010), de juiste voeding en gesimuleerde migratie (Mes et al., 2016). Met wilde vrouwelijke schieralen als positieve controles worden ze tot afrijping gebracht door hypofysatie (wekelijkse injecties met hypofyse extract - CPE) toe te passen (Palstra et al., 2005). Tenslotte wordt de ovulatie geïnduceerd met een DHP (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) injectie. Wilde mannelijke schieralen kunnen met een enkele hCG (human chorionic gonadotropin) injectie tot afrijping worden gebracht waarna een tweede injectie zorgt voor goed kwaliteitssperma. Ouders worden gestript, eieren worden bevrucht en vervolgens gevolgd in hun ontwikkeling na uitkomen van de eieren. Ondermaatse vitaliteit van de larven voorkomt de volgende stap om de larven op voer te krijgen vanaf 15 dagen na uitkomen van de eieren onder de huidige condities. Die stap is essentieel in de productie van een eerste generatie glasaal dat uitgangsmateriaal vormt voor het sluiten van de productiecycclus.

Eikwaliteit

Om vitale larven te verkrijgen zal allereerst de eikwaliteit verbeterd moeten worden. Dat kan enerzijds door verfijning in conditionering van de ouderdieren. 5.1 lid2f

Anderzijds kan de eikwaliteit verbeterd worden door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën. 5.1 lid2f

Nachtelijke paai activiteiten zullen worden gemonitord door toepassing van accelerometer sensoren. Tot slot moet eikwaliteit gefenotypeerd kunnen worden om uitspraken te kunnen doen over de kwaliteit van de betreffende eibatch, het succespercentage te kunnen voorspellen en mogelijk zelfs tot selectie van goede eieren over te kunnen gaan. 5.1 lid2f

Larvenvitaliteit

Naast verbetering van de eikwaliteit, kan verbetering van de larvale vitaliteit allereerst bereikt worden door aanpassingen in hatchery en nursery condities. Optimalisaties zullen niet alleen voor paling van belang zijn maar ook voor andere pelagische vissoorten die miljoenen eieren kunnen afzetten maar met minimale investering in elk van die eieren zodat de larven zeer kwetsbaar zijn (bv. tonijn- en makreelsoorten). Kweeksystemen voor elk van de opvolgende fasen (eieren; vroege inactieve larven; actieve en voedende larven in Kreisel tanks - Okamura et al., 2009) moeten constant worden geoptimaliseerd om aan de eisen van de larven tegemoet te komen. Temperatuur, licht en saliniteit spelen een belangrijke rol (Politis et al., 2014, 2017, 2018) en waarschijnlijk geldt dat ook voor dichtheden, waterkwaliteitsparameters en zuurstofgehalten. De aanzienlijke kennis en ervaring met opkweek van mariene soorten binnen 5.1 lid2h zal bijdragen aan het innoveren en optimaliseren van de kweeksystemen.

Fenotypering van de larvale kwaliteit en bestudering van de fysiologische mechanismen die een rol spelen in de larvale ontwikkeling en overleving zal moeten plaatshebben om de origine van abnormaliteiten in kaart te kunnen brengen. Bovendien kan die larvenkwaliteit vervolgens worden geassocieerd met afkomst, eikwaliteit, kweeksystemen en -condities zodat er ook naar oplossingen gestreefd kan worden. 5.1 lid2f

Tenslotte zullen alle maatregelen voor het verhogen van de ei- en larvenkwaliteit zich moeten bewijzen in exogeen voedende larven. 5.1 lid2f

5.1 lid2f

Zeer recentelijk zijn ook al groepen larven van de Japanse aal tot glasaal opgekweekt met een dieet gebaseerd op gangbare conventionele mariene ingrediënten (Masuda et al., 2016). Naast de samenstelling van de diëten is ook de vorm (partikels of pasta; textuur) en de wijze van aanbidding (verspreid in het water of lokaal als aggregaat) van belang. 5.1 lid2f

Dit vertaalt zich in specifieke taken (T) met elk eigen mijlpalen of 'milestones' (M):

5.1 lid2f

Referenties

Chai Y., Tosaka R., Abe T., Sago K., Sago Y., Hatanaka E., Ijiri S. and Adachi S. (2010) The relationship between the developmental stage of oocytes in various seasons and the quality of the egg obtained by artificial maturation in the feminized Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture Sci.* 58, 269-278.

- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Giménez Nebot, I., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Komen, H. (2021a) First European eel larvae produced using recombinant FSH and LH - in vivo and in vitro effects on oocyte maturation and reproductive success. Aquaculture Europe, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.
- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Heinsbroek, L.T.N., Kruijt, L., Dirks, R.P., Swinkels, W., Komen, H. (2021b) What goes wrong during early development of artificially reproduced European eel *Anguilla anguilla*? Clues from the larval transcriptome and gene expression patterns. *Animals* 11, 1710.
- Masuda, Y., Yatabe, T., Matsunari, H., Furuita, H., Kamoshida, M., Shima, Y., Kuwada, H. (2016) Rearing of larvae of Japanese eel *Anguilla japonica* to metamorphosis into glass eel by feeding with fish protein hydrolysate-based diets. *Nippon Suisan Gakkaishi* 82(2): 131-133.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367-372.
- Miller, M.J., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Yamada, Y., Tsukamoto, K., Ohkouchi, N. (2013) A low trophic position of Japanese eel larvae indicates feeding on marine snow. *Biol. Lett.* 2013 9, 1-5.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y. (2007) Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. eds. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer pp. 437-476.
- Nguyen AT, Chia JHZ, Kazeto Y, Wylie MJ, Lokman PM. (2020) Induction of oocyte development in previtellogenic eel, *Anguilla australis*. *General and Comparative Endocrinology* 291, 113404.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Tanaka, S., Kobayashi, H., Tsukamoto, K. (2013) Hen egg yolk and skinned krill as possible foods for rearing leptocephalus larvae of *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. *Aquaculture Research* 44, 1531-1538.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horita, T., Horie, N., Mikawa, N., Utoh, T., Tanaka, S., Tsukamoto, K. (2009) Rearing eel leptocephali (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) in a planktonkreisel. *Aquaculture Research* 40, 509-512.
- Palstra, A.P., Bouwman, L.J., Jéhannet, P., Kruijt, L., Schipper, H., Blokland, M.H., Swinkels, W.S., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M. (2021) 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol implant effects on the induction of vitellogenesis in feminized European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.
- Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S. (2020) First observation of a spontaneously matured female European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific Reports* 10: 2339
- Politis SN, Butts IAE, Tomkiewicz J (2014) Light impacts embryonic and early larval development of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 461, 407-415,
- Politis SN, Mazurais D, Servili A, Zambonino-Infante J-L, Miest JJ, Sørensen SR, et al. (2017) Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS ONE* 12(8): e0182726.
- Politis SN, Mazurais D, Servili A, Zambonino-Infante J-L, Miest JJ, Tomkiewicz J, et al. (2018) Salinity reduction benefits European eel larvae: Insights at the morphological and molecular level. *PLoS ONE* 13(6): e0198294.
- Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), *Eel Biology*, Springer, Heidelberg pp. 427-434.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

In de afgelopen vijf jaar hebben we uitstekende onderzoeksfaciliteiten weten te realiseren. We hebben de conditionering van ouderdieren verbeterd zodat we in 1,5 jaar van juveniele glasaaltjes goede ouderdieren kunnen maken die gewend zijn aan hanteren en houderij. Hiermee zijn we niet meer afhankelijk van wilde ouderdieren die tenminste 7 tot wel 50 jaar oud zijn, stress hebben door vangst en transport, ziektes meebrengen en soms hoge mortaliteit vertonen. Daardoor kunnen we nu zowel larven produceren van wilde alen als van geconditioneerde alen met gelijke efficiëntie. Inmiddels produceren we twee keer per week gecontroleerd tot wel 100,000 palinglarven die tot 25

dagen in leven blijven. Ei- en larvenkwaliteit is echter nog laag en zeer variabel. Embryo mortaliteit is hoog en hatching percentages zijn laag. Na 15 dagen zouden de larven in staat zijn om te gaan eten maar ook de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats, ze overleven de eerste week niet en/of ze vertonen afwijkingen/misvormingen. Om de larven tot exogeen voeden aan te zetten zullen we op dat moment nog duizenden vitale larven moeten hebben aangezien voedingsgedrag dichtheid-afhankelijk lijkt. Een uitgebreidere beschrijving is toegevoegd als de bijlage "kennis, innovaties en tools vanuit het internationaal paling reproductie onderzoek en het 5.1 lid2h periode 2016-2021" onder documenten.

Hoewel taken elkaar opvolgen in het reproductieproces kunnen ze onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Het uitvoeren van een volgende taak is dus niet specifiek afhankelijk van het succes van een eerdere taak. Er is dus geen sprake van go/no go momenten, alleen momenten waarin wordt afgewogen of een innovatie wel of niet onderdeel wordt van het standaard reproductieprotocol.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven
2	Monsterafname van voedende larven



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h					
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h					
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	<table border="1"> <tr> <th data-bbox="587 1301 852 1346">Serial number</th> <th data-bbox="852 1301 1517 1346">Type of animal procedure</th> </tr> <tr> <td data-bbox="587 1346 852 1422">1</td> <td data-bbox="852 1346 1517 1422">Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven</td> </tr> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	
Serial number	Type of animal procedure					
1	Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Appendix 1 betreft de stimulatie van ouderdieren voor productie van eieren en larven. Ouderdieren betreffen hier gefeminiseerde en wilde vrouwelijke ouderdieren en mannelijke wilde ouderdieren. Stimulatie betreft het traject van schieraal tot gematureerde aal, het tot afrijping brengen. Enerzijds brengen we dieren tot afrijping om zo eieren en larven te produceren om daaraan te meten. Anderzijds proberen we de eikwaliteit te verbeteren door verfijning in de conditionering van de ouderdieren, en door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën. Die testen worden in de tijd herhaald om zo verder te kunnen optimaliseren.

Vrouwelijke schieralen worden tot afrijping gebracht door hypofysatie (wekelijkse intramusculaire injecties van hypofyse extract) toe te passen (Palstra et al., 2005). Tenslotte

wordt de ovulatie geïnduceerd met een 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) injectie. Wilde mannelijke schieralen kunnen met een enkele hCG (human chorionic gonadotropin) injectie tot afrijping worden gebracht waarna een tweede injectie zorgt voor goed kwaliteitssperma. Het afrijpen van de vrouwtjes wordt geïnduceerd door een toename in het gewicht vanwege een hydratatie respons van de oocyten. Zodra gewichtstoename meer dan 20% bedraagt wordt de finale maturatie en ovulatie geïnduceerd. Gameten van mannetjes en vrouwtjes worden vervolgens afgestroken en bevrucht.

5.1 lid2f

Overige dieren worden dan tot afrijping gebracht om vervolgens reproductiesucces (aantal injecties tot maturatie, eikwaliteit, larvenvitaliteit) te kunnen correleren aan behandeling. 5.1 lid2f

Primaire uitkomstparameters betreffen gonadenhistologie, hormoonniveaus en genexpressie langs de reproductieve as hypothalamus-hypofyse-lever-gonaden. De parameters die worden gemeten stellen de onderzoekers in de staat de maturatie status vast te stellen en daarmee verschillen tussen groepen ten aanzien van de gestelde vraag te kunnen duiden. De proef is geslaagd als de vraag, positief of negatief, beantwoord kan worden. Gonadenmassa wordt bepaald door tijdens de dissectie beide gonaden te wegen. In relatie tot het lichaamsgewicht geeft dit de GSI. Gonadenhistologie zal in staat stellen het ontwikkelingsstadium te duiden. Hormoonniveaus in de gonaden, met name van androgene en oestrogene steroïden, en enzymen als aromatase die omzetting realiseren, worden gemeten (ELISA en/of RIA) en de genexpressie van aromatase en steroïdreceptoren wordt dan bepaald. Circulerende hormoonniveaus worden bepaald in plasma en genexpressie wordt bepaald (qPCR en/of RNAseq) in de gonaden en langs de reproductieve as hypothalamus (e.g. Gonadotropin Releasing Hormone - GnRH) - hypofyse (e.g. LH, FSH) - lever (e.g. oestradiol receptor, vitellogeninen).

5.1 lid2f

Reproductiesucces zal worden gecorreleerd aan de behandelingen. 5.1 lid2f

Incidentele gevallen van spontane maturatie en natuurlijke paai zullen worden gemonitord.

Aangezien de onderzoeksfocus in dit project ligt op eikwaliteit en larvenvitaliteit is het grootste deel van de experimentele wilde ouderdieren vereist voor productie van eieren en larven.

5.1 lid2f

De hatching assays zijn wells platen waarin een 100 tal individuele eieren wordt gehouden om zo percentueel te kunnen bepalen welke eieren wanneer stoppen met ontwikkelen en welke uiteindelijk uitkomen (hatchen). 5.1 lid2f

5.1 lid2f

. De vitaliteit van individuele larvenbatches wordt bepaald door inschatting van aantallen, bepaling van mortaliteit en monitoring van deformaties. De vitaliteit wordt gekoppeld aan het type systeem en de condities, aan de aanpassingen in beiden en experimentele behandelingen met antibiotica, desinfectie methoden en verlaging van saliniteit. Net als voor de eikwaliteit zullen we larvale kwaliteit karakteriseren door histologische en fysiologische bestudering.

Succesvolle verbetering van eikwaliteit en larvenvitaliteit zal zich uiten door het produceren van tenminste 5000 larven zonder abnormaliteiten op dag 15 wanneer met exogeen voeden zou moeten worden begonnen. Monsterafname van deze voedende larven wordt beschreven in appendix 2.

Referenties

Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547.

Palstra, A.P., Bouwman, L.J., Jéhannet, P., Kruijt, L., Schipper, H., Blokland, M.H., Swinkels, W.S., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M. (2021) 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol implant effects on the induction of vitellogenesis in feminized European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Bij aanvang van hormonale stimulatie zullen alle vrouwelijke alen éénmalig verdoofd worden en geïnjecteerd worden met een PIT ID tag (Trovan). Vervolgens vinden biometrische metingen plaats (lengte, gewicht, lichaamsomtrek en oogdiameters).

In het geval dat dieren deel uitmaken van een steroid implantaat of hCG test wordt ook een

5.1 lid2f

5.1 lid2f

5.1 lid2f

5.1 lid2f

Referenties

Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547.

Sørensen, S.R., Tomkiewicz, J., Munk, P., Butts, I.A.E., Nielsen, A., Lauesen, P., Graver, C (2016) Ontogeny and growth of early life stages of captive-bred European eel. *Aquaculture* 2016, 456, 50–61

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Bepaling van het aantal dieren per groep (voor dissectie en monsterafname) is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiële reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	89 - Other Fish*	05	juveniel	1564	vrouw	nvt	nvt
2	89 - Other Fish*	05	juveniel	393	man	nvt	nvt

Provide justifications for these choices

Species

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla* aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort.

Origin

5.1 lid2f

Life stages

De juvenielen worden in de eigen faciliteiten opgekweekt to broodstock dieren. De wilde broodstock dient als positieve controle en als uitgangsmateriaal voor ei- en larvenproductie aangezien reproductief success hoger ligt.

Number

De meest recente resultaten over 2021 laten zien dat we inmiddels 84% van de vrouwtjes paling waarmee we de stimulatie starten tot volledige maturatie kunnen brengen. Van 77% van deze dieren krijgen we eieren en van 57% larven. Deze percentages zijn als uitgangspunt genomen voor de bepaling van de aantallen benodigde dieren in deze aanvraag. Voor dissectie wordt N=10 aangehouden zoals beargumenteerd onder A. Voor het aantal vrouwen per taak geldt:

5.1 lid2f

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

5.1 lid2f

In totaal zijn dus 1564 vrouwelijke dieren en 393 mannelijke dieren nodig.

Gender

Zowel mannen als vrouwen zijn nodig voor de productie van nakomelingen.

Genetic alterations

nvt

Strain

nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Dieren kunnen ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Stress tgv hanteren; éénmalige of wekelijkse injectie met hormonen, implantaten of van een PIT tag; bloedafname; het afstrijken van gameten.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Goede dierverzorging tracht effecten te minimaliseren. Verdoving wordt toegepast voorafgaand aan meting en behandeling.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Licht ongerief door het vangen en licht verdoven; het meten en wegen; de stress die optreedt door hanteren; het injecteren; en het doden. Bij bloedafname en het geven van 12 of meer wekelijkse injecties wordt ingeschat dat het cumulatieve ongerief matig is. Dit geldt voor 36% van de vrouwelijke dieren, bij overige dieren wordt geen bloed afgenomen en/of is het aantal wekelijkse injecties lager dan 12. Mannelijke dieren ondervinden licht ongerief van de twee injecties die in totaal worden toegediend en het afstrijken van gameten. De experimentele opstellingen zelf leveren geen of onderdrempelig ongerief.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen.

Reduction

In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.

Refinement

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zal de seksuele maturatie en reproductie als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol. Door toepassing van de langzaam uitlekkende hormoonpreparaten hebben we het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes (en daarmee ook het wekelijkse verdoven en hanteren) weten te reduceren van gemiddeld 14 naar 8. Voor de mannetjes geldt een bestaand protocol van wekelijkse injecties (tenminste 10) die we hebben kunnen vervangen door 2 injecties. Indien we meer kennis verzamelen over het natuurlijk stimuleren van de maturatie zullen injecties verder, of zelfs geheel, kunnen worden ingeperkt.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

nvt

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment**K. Destination of the animals**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Dieren worden ge-euthanaseerd door een overdosis phenoxy ethanol.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Voor de andere dieren geldt dat schieralen niet meer eten en dus uiteindelijk zullen sterven als ze niet onmiddellijk worden ge-euthanaseerd.



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Monsterafname van voedende larven

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Tenslotte zullen alle maatregelen voor het verhogen van de ei- en larvenkwaliteit zich moeten bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Daartoe zullen we larvale voedingsproeven doen met batches die hoge overleving vertonen, weinig abnormaliteiten vertonen en een hoge vitaliteit kennen op 15 dagen na hatching. Optimale diëten en voedingssystemen zullen daarvoor worden ontworpen.

Appendix 2 betreft de monsterafname van voedende larven, larven die actief zwemmen en voeding-zoekend gedrag vertonen vanaf dag 15 na uitkomen van het ei onder de huidige condities en succesvol foerageren op aangeboden voeding.

Voor deze taak kan een batch goede kwaliteitslarven op dag 15 worden opgesplitst om diverse diëten te testen, en vervolgens te optimaliseren. Daarbij wordt gedacht aan tenminste 5,000 vitale larven per batch. In dat geval zouden 5 diëten op elk 1,000 larven kunnen worden getest.

5.1 lid2f

Respons en voedingsgedrag voor elk van die diëten zal worden gemonitord. Monsters zullen worden genomen om de larvale ontwikkeling te bestuderen. Die monsters worden genomen om een ontwikkelingsreeks in kaart te brengen van de start van exogeen voeden tot metamorfose naar glasaal hetgeen wordt verwacht op 200 tot 250 dagen na hatching.

Referenties Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), Eel Biology, Springer, Heidelberg pp. 427–434.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

5.1 lid2f

Zodra we larven op voer kunnen krijgen zullen monsters genomen worden en moet dit worden betiteld als dierproef. Larvenmonsters worden microscopisch onderzocht en gepreserveerd in formaline en RNA later voor histologisch en (in situ) genexpressie onderzoek.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Bepaling van het aantal dieren per groep (hier het aantal gemonsterde larven per tijdstip) is gebaseerd op ervaring van groeps grootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groeps grootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groeps grootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	89 - Other Fish*	05	larvaal	2000	nvt	nvt	nvt

Provide justifications for these choices

Species

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla* aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort.

Origin

Herkomst betreft eigen kweek.

Life stages

De proefdieren zijn voedende larven die gemonsterd worden.

Number

Voor het testen van diëten wordt uitgegaan van 10 goed larvenbatches die worden geproduceerd van elk tenminste 5,000 larven. Nog eens 10 batches worden gebruikt voor monsterafname bestaande uit 10 tijdstippen: 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150 en 200 dagen na hatching. Voor elk tijdstippen worden 10 larven gemonsterd in twee diverse media – formaline en RNAlater) die worden gebruikt voor de monsterafnames. Larven die voeding-zoekend gedrag vertonen maar niet eten worden ook in leven worden gehouden tot max. 18 dagen.

Zodoende zijn in totaal 2,000 voedende larven vereist (10 batches x 10 tijdstippen x 10 larven x 2 media – formaline en RNAlater) die worden gebruikt voor de monsterafnames. Larven die voeding-zoekend gedrag vertonen maar niet eten worden ook in leven worden gehouden tot max. 18 dagen.

Gender

nvt

Genetic alterations

nvt

Strain

nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Dieren kunnen ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten. De professionele diervverzorgers zorgen voor optimale systeemomstandigheden en waterkwaliteitscondities. Bovendien monitoren ze de larven dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Larven hangen in eerste instantie verticaal in de waterkolom. Larven die dan in cirkeltjes zwemmen zijn afwijkend en worden ge-euthanaseerd. Later vertonen de larven actief zwemgedrag, afwijkende larven zouden dan sterven.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Simulatie niet mogelijk, alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.

Reduction

In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.

Refinement

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Ook hier zal elke vorm van stress nadelig zijn voor het experimentele resultaat. Er wordt geen ongerief verwacht.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.
nvt

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Euthanasie voor monsterafname. Overige larven worden verder opgegroeid.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Overdosis verdoving met phenoxy ethanol.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

nvt

Naam van het project	Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)
NTS-identificatiecode	NTS-NL-630091 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	paling voortplanting eikwaliteit vislarven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Ethologie/diergedrag/dierbiologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Dierenwelzijn

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Het sluiten van de productiecycclus van de paling kan zowel een duurzame aquacultuur realiseren als bijdragen aan een duurzaam natuurlijk bestand. In het 5.1 lid 2h produceren we inmiddels drie keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dit project heeft het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Migrante soorten die net als de paling van belang zijn voor consumptie, maar waarbij het scheppen van kweekmogelijkheden ook van belang is voor instandhouding van de natuurlijke populaties. De innovatieve technologieën zijn gericht op verbetering van de eikwaliteit door verfijning in conditionering van de ouderdieren; optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën, en typering van de eikwaliteit. Maar ook direct op verbetering van de larvenvitaliteit door aanpassingen in opgroeicondities; typering van de larvale kwaliteit en bestudering van de fysiologische mechanismen achter larvale ontwikkeling en overleving, en tenslotte formulering van optimale diëten, ontwerpen van voedingssystemen en ultieme bewijsvoering door het doen van larvale voedingsproeven.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).</p>	<p>De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit. Het publiek is gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid. Een gesloten</p>

productiecyclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluisen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Vrouwtjespaling wordt tot afrijping gebracht door wekelijkse hormooninjecties (8-14 injecties met hypofyse extract). Bij gewichtstoename zullen dieren worden gewogen om te bepalen of de eitjes opzwellen (max 8 keer), uiteindelijk zal ook een biopsie worden genomen om het ontwikkelingsstadium te bepalen. Als dieren klaar zijn om af te rijpen krijgen ze een extra injectie met hypofyse extract en een injectie met een hormoon om de ovulatie te stimuleren waarop dieren eitjes gaan afgeven. Getest wordt of deze periode kan worden ingekort en of de eikwaliteit kan worden verbeterd door gebruik van palingspecifieke hormonen of eenmalige injectie van hormoonimplantaten. Dieren worden dan doorgemeten op externe en interne kenmerken (door het maken van een echo) en een deel van de dieren wordt gebruikt voor dissectie. Mannetjes worden tot afrijping gebracht door een eenmalige injectie met hCG (human chorionic gonadotropin). Bij het afgifte van sperma ontvangen ze nog een injectie ter verhoging van de spermakwaliteit. Tenslotte worden de eitjes en sperma van mannetjes en vrouwtjes afgestreeken en bevrucht. Daartoe wordt de buikholte licht gemasseerd richting cloaca. Ontwikkende eitjes komen uit en de larven ontwikkelen dan door tot 15 dagen na uitkomen. Dan zouden larven kunnen eten en wanneer ze dat doen zullen larven worden gemonsterd om de ontwikkeling te bestuderen.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Ouderdieren kunnen stress ondervinden tgv hanteren; éénmalige of wekelijkse injectie met hormonen, implantaten of van een PIT tag ('Passive Integrated Transponder', een kleine implanteerbare transponder voor individuele identificatie); bloedafname, en het afstrijken van gameten. Bij alle handelingen worden dieren licht verdoofd. Voedende larven ondervinden licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Andere vissen (other Pisces)</td> <td>3957</td> <td>0</td> <td>3393</td> <td>564</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Andere vissen (other Pisces)	3957	0	3393	564	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Andere vissen (other Pisces)	3957	0	3393	564	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren worden gedood voor dissectie of monsterafname. Overige dieren worden na gebruik ook gedood omdat schieralen niet meer eten en zodoende uiteindelijk zouden sterven. Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om uiteindelijke dood voorkomen.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen. Ook zijn alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zullen de seksuele maturatie, reproductie en larvale ontwikkeling als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol.
Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe	De experimentele vissoort betreft de Europese aal <i>Anguilla anguilla</i> aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort. De stadia betreffen afrijpende ouderdieren (schieralen) en voedende larven.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 6 april 2022 14:11
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 02215973
Bijlagen: NTS_template_1.0_2022.D_0005_os.xlsx; 2022.D_0005_PV_1_os_tek.pdf; 2022.D_0005_PP_os_2_.pdf; 2022.D_0005_DAP_os_2_.pdf

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL)" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202215973.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 06-04-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 06-04-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

5.1 lid2h 03-05-2022

Geachte CCD,
Onderstaand het advies dat de 5.1 lid2h geeft aangaande het betreffende project.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD** 5.1 lid2h **202215973**
2. Titel van het project: Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglaven (LARvitAAL)
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglaven (LARvitAAL)
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning.
5. Contactgegevens DEC:
5.1 lid2h
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 06-04-2022
Aanvraag compleet: 06-04-2022
In vergadering besproken: 11-04-2022
Anderszins behandeld: n.v.t.
Termijnonderbreking van 19-04-2022 tot 20-04-2022
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 25-04-2022
Advies aan CCD: 03-05-2022
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager
Datum: 11-04-2022
Plaats: 5.1 lid2h en via Teams
Aantal aanwezige DEC-leden: 8
Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
Gestelde vragen *en antwoorden*:
 - De aantallen dieren zijn voor de DEC niet navolgbaar. De onderzoeker geeft aan dat men is uitgegaan van succespercentages van eerder onderzoek en dat per taak de aantallen daarop zijn gebaseerd. De onderzoeker geeft aan dat de aantallen per batch (geschat o.b.v. dichtheidsmetingen) enorm varieert en dat een ondergrens van 5000 larven in een batch aangehouden wordt om überhaupt te starten met een experiment. Het is de DEC niet duidelijk hoe men dan uiteindelijk aan 2000 proefdieren komt. De onderzoeker geeft aan dat de larven 15 dagen na uitkomen pas exogeen voeden. Tot nu toe kunnen ze de uitgekomen larven 25 dagen in leven houden om er onderzoek aan te doen. Om met 2000 exogeen voedende larven onderzoek te kunnen doen is het dus nodig om minimaal 5000 larven per batch te starten, gezien het hoge

uitvalspercentage tot het stadium dat de larve het exogeen voedende stadium bereikt. De onderzoeker moet dit beter uitwerken in de aanvraag. Wat is bijv. de primaire uitleesparameter en kunnen de aantallen daarop gebaseerd worden.

Er is dus sprake van twee aantallen. Allereerst moet op dag 15 sprake zijn van een batch van 5000 larven om een voedingsexperiment te kunnen doen. Dan worden per batch vervolgens max 2000 larven in een reeks gesampeld. Dit is verduidelijkt in de tekst (appendix 2, b1) naast de tabel die is toegevoegd.

- Er wordt gevraagd naar het antibioticagebruik in de experimenten. De onderzoeker geeft aan dat het zeker niet de bedoeling is dat dit in de praktijk ook zo ingezet gaat worden. Men wil dit in de productieketen niet gebruiken. In de experimenten gebruikt men antibiotica om de eerste week te overwinnen omdat bekend is dat dat met deze antibiotica lukt. De kennis die dat oplevert wordt dan gebruikt om voor de praktijk te werken naar een systeem zonder standaard antibioticagebruik. Als alternatief gaf de onderzoeker aan dat gebruik zou kunnen worden gemaakt van goed gematureerd zeewater. Het doel van dit project is dan ook voornamelijk fundamenteel onderzoek en is vooral gericht op het sluiten van de cyclus en het niet meer nodig hebben van wildvang voor de commerciële kweek. Het uiteindelijke doel (een duurzame palinghouderij) is een doel dat nog ver weg ligt. In de toekomst zal in de praktijk gestreefd worden naar domesticatie van de paling in een systeem met een natuurlijke reproductie; iets dat in dit project niet het geval is, gezien het fundamentele karakter van de proef. Samengevat past men nu allerlei interventies en behandelingen toe om meer over de reproductie te weten te komen, waarna die kennis gebruikt wordt voor een natuurlijkere palinghouderij in de toekomst. De toekomst wordt door de onderzoeker geschetst. Het zal minimaal 10-15 jaar duren voor er een gedomesticeerde commerciële palinghouderij kan bestaan. Het onderzoek loopt nu al 5 jaar, waarbij het 1^e deel van de cyclus succesvol kan worden nagebootst. De komende 5 jaar richt het onderzoek zich op het levensvatbaar maken van de glasaal.
- *Correct, dit is verduidelijkt in de tekst. Toegevoegd (PP, 3.2.1): 'Het beschreven onderzoek met als doel de productiecycclus van de paling te sluiten is een fundamenteel wetenschappelijke uitdaging. Het gebruik van hormonen om paling tot reproductie te brengen en antibiotica om larven te laten overleven stelt in staat deze processen te bestuderen. Vervolgens kan dan voor een toekomstige productie omgeving worden onderzocht hoe de hormonale interventies kunnen worden vervangen door gebruik te maken van natuurlijke triggers en hoe antibiotica weer kan worden vervangen door gebruik te maken van de microbiële samenstelling van gerijpt zeewater. Bovendien zal dat worden vergemakkelijkt door verdergaande domesticatie. En uiteindelijk zal het ouderdier dat tot reproductie wordt aangezet niet worden geconsumeerd, alleen de nakomelingen.'*
- De DEC vraagt aan de onderzoeker of men voor de commerciële palinghouderij geen Japanse aal kan gebruiken omdat men daar al verder in het proces is. De onderzoeker legt uit dat de Japanse paling minder vet is (hoeft minder ver te zwemmen voor reproductie) en daardoor niet geschikt is voor de rokerij en dat men in Japan juist meer de rauwe vis eet. Juist gerookte paling is in Nederland het meest gegeten palingproduct. De onderzoeker geeft ook aan dat de Japanners al 5 generaties gesloten cyclus hebben, maar tegen veel deformiteiten aan lopen. Het is ook de bedoeling om de knelpunten waar men in Japan tegenaan loopt in de Nederlandse situatie te adresseren en op te lossen voor men de stap maakt naar gedomesticeerde commerciële palinghouderij. Uiteindelijk zullen alleen de volwassen palingen een hormoonbehandeling ondergaan om de rijping te beïnvloeden en het rijpingsinterval te verkorten van 5 naar 1,5 jaar. De glasaal die de uiteindelijk consumptievis wordt zal niet met hormonen worden behandeld. De onderzoeker gaf aan dat de paling als modeldier wordt gezien, voor de andere genoemde vissoorten die genoemd zijn in dit project.

- *Correct, dit is verduidelijkt in de tekst. Toegevoegd (PP, 3.1): 'De Japanse aal hoeft minder ver te zwemmen naar de paaigronden in de Marianentrog en is daarom minder moeilijk te reproduceren. Maar aangezien ze minder ver hoeven te zwemmen zijn ze ook minder vet en daarom niet geschikt voor de rokerij. Het onderzoek richt zich daarom op de Europese paling. Bovendien kampt men zelfs in de vijfde generatie van Japanse aal nog altijd met dezelfde problematische issues die we in ons onderzoek direct trachten op te lossen.'*

9. Correspondentie met de aanvrager

Datum vragen: 20-04-2022

Gestelde vragen en antwoorden:

- De DEC vraagt zich af wat er met het afvalwater uit het project gebeurt. Dit is verontreinigd met o.a. antibiotica en hormonen.

Wij verwachten geen verontreiniging van afvalwater met hormonen. Gonadotropines hebben een zeer korte halfwaardetijd (minuten) en spelen dan geen rol. De halfwaardetijd van steroïden is langer (uren-dagen) maar de verontreiniging is niet significant. Collega's van de Leiden Universiteit hebben estradiol gemeten in het afvalwater van estradiol gevoerde paling maar die niveaus waren lager als in het tapwater. Overigens scheiden de maturerende vissen zelf ook op natuurlijke wijze hormonen af dus een onderscheid is niet of nauwelijks te maken.

Antibiotica wordt gebruikt in zeer lage hoeveelheden aangezien de watervolumes waarin de eieren en larven worden gehouden laag zijn. Vervolgens wordt door verdunding van het afvalwater de verontreiniging zeer beperkt.

Aangezien er ja of nee moet worden beantwoord is er met 'nee' beantwoord onder 'adverse environmental effects') hetgeen geen ruimte biedt om verdere uitleg toe te voegen.

- De aantallen zijn niet navolgbaar. O.b.v. ervaringen uit eerder onderzoek kan in de ogen van de DEC beter statistisch onderbouwd worden waarom deze aantallen dieren nodig zijn. Om de aantallen meer navolgbaar te maken kan de onderzoeker bijv. een tabel toevoegen waarin ook de aantallen dieren benoemd worden die uiteindelijk bemonsterd zullen worden.

Voor beide appendices is een tabel gemaakt en in APandE toegevoegd. Inderdaad zat er een foutje in de optelling van het aantal vrouwelijke dieren dat is aangepast.

- De DEC zou ook graag meer inzicht hebben in hoe de aantallen bepaald/ gemeten worden. Het lijkt de DEC ondoenlijk om de individuele dieren te tellen bij deze grote hoeveelheden.

Aantallen van N=10 worden voor monsterring aangehouden, deze larven worden individueel bepaald. Hoeveelheden larven in een batch of bekersglas worden ingeschat op basis van dichtheid. Deze tekst is toegevoegd (appendix 2, 2a).

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan. Paling staat op de rode lijst maar glasaal mag aangevoerd worden. Het onderzoek kan ertoe leiden dat glasaal in de toekomst niet meer uit het wild hoeft te worden gehaald t.b.v. de commerciële palingkweek.

3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is de ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale palinglarven, die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het bewerkstelligen van een succesvolle kunstmatige reproductie van paling, die zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in Nederlandse aquacultuurbedrijven
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - De proefdieren hebben een welzijnsbelang en zullen nadelen ondervinden door de proefbehandelingen
 - de doeldieren zijn op te splitsen in twee categorieën:
 - palingen in het wild hebben een welzijnsbelang en een ecologisch belang; zij hebben mogelijk voordeel omdat er minder vangst uit het wild t.b.v. commerciële palingkweek nodig is en zij hoeven niet in gevangenschap op te groeien tot consumptiepaling.
 - De productie-aal heeft geen voordeel want er komen er meer die in gevangenschap leven.
 - de branche-organisatie/viskwekers hebben een commercieel belang wanneer zij paling kunnen kweken zonder afhankelijk te zijn van wildvang van glasaal.
 - de onderzoekers/^{5.1 lid2b} hebben zowel een wetenschappelijk belang bij het vergaren van kennis als ook een economisch belang omdat het onderzoek in opdracht uitgevoerd wordt.
 - het ecosysteem heeft belang bij minder vangst van wilde glasaal.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten en zoals uit de antwoorden van de onderzoeker blijkt is de DEC niet unaniem van mening dat er geen aanleiding is om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. Met name één van de DEC-leden houdt zorg over de verontreiniging van het afvalwater en is van mening dat de onderzoekers hier te lichtzinnig over denken. Ook al wordt de antibiotica in het afvalwater zeer verdund en is het risico van verontreiniging zeer beperkt, het risico is er wel! Ook de korte halfwaardetijd van de hormonen is wat dit DEC-lid betreft onvoldoende reden om de effecten op het milieu niet in twijfel te trekken. Ook na een korte halfwaardetijd blijft de andere helft nog onveranderd aanwezig en hoe het dan is afgebroken kan op zichzelf ook schadelijk zijn. (Bekend is dat het eten van vlees van dieren die met hormonen zijn behandeld ook na de wachttijd toch schadelijk is). Dit DEC-lid geeft aan dat het als voorwaarde voor vergunning graag ziet dat het afvalwater in voldoende mate gezuiverd wordt voordat het in het afvalwatersysteem geloosd wordt.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Deze onderzoeksgroep heeft al ruime ervaring met dit onderzoeksgebied.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Echter, de DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica. Hoewel de onderzoekers aangeven dat het niet de bedoeling is dat dit voor de praktijk ontwikkeld zal worden is het blijkbaar op dit moment wel noodzakelijk om preventief antibiotica in te zetten om de larven in leven te houden. De verleiding is dan ook groot om bij succes in productie van glasaal, dit in stand te houden, mochten er geen alternatieven te bewerkstelligen zijn. Ook het gegeven, dat de onderzoeker een aantal verschillende antibiotica wil testen stemt de DEC niet hoopvol. Als je uiteindelijk toe wil naar een antibioticavrije productie van glasaal, lijkt de DEC de start hiernaar essentieel. Echter, het betreft hier ook wetenschappelijk onderzoek (in een kleine setting) in het hele traject van reproductie-ei-larve-glasaal. Op die gronden is de insteek van de onderzoeker te billijken, ondanks het gebruik van antibiotica, wat tot nu toe het enige is, dat succesvol blijkt in de overleving van glasaal, om ook tevens onderzoek te doen naar de ontwikkeling van ei tot glasaal. De DEC zou liever zien dat de onderzoeker op basis van Good Veterinary Practice

antibiotica therapeutisch inzet en dus eerst diagnostiek bedrijft en aan de hand daarvan een keuze maakt voor meest effectieve antibiotica. Verder zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4), paling staat op de Europese rode lijst
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Op dit moment is palingkweek van Europese aal in gevangenschap nog niet mogelijk dus moeten glasaaltjes uit het wild gebruikt worden. De dieren uit bijlage 1 worden gebruikt in bijlage 2, maar de DEC vraagt zich af of dit als hergebruikt geclassificeerd moet worden.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: narcose en diverse biotechnische handelingen zoals injecties, biopteren, wegen, echografie en afstrijken eitjes en sperma.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. De integriteit van de dieren wordt aangetast door vangst uit het wild en in gevangenschap houden van de dieren, diverse invasieve biotechnische handelingen, het kunstmatig geslachtsrijp maken en het doden van de dieren.
13. Er zijn geen proefgerelateerde Humane Eindpunten, hoewel er (net als in de natuur) veel spontane sterfte optreedt. Er wordt bij zichtbare gezondheidsproblemen volgens GVP (Good Veterinary Practice) gehandeld

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er zijn geen alternatieven om deze proeven zonder dieren uit te voeren. Er is wel een maatschappelijk alternatief: paling wordt gezien als een luxeproduct (vergelijk bont/nertsenuhouderij) en niet een noodzakelijke voedselbron. Stoppen met eten van paling zou dit soort onderzoek overbodig maken.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven, afgaande op de handvatten die de onderzoekers aangeven. Het aantal hormooninjecties is teruggebracht t.o.v. eerder onderzoek. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is: voor het bereiken van de doelstellingen van het onderzoek zijn meer vrouwelijke dan mannelijke dieren nodig.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Op een vraag van de DEC over hergebruik van de dieren heeft de onderzoeker geantwoord dat de dieren, analoog aan de vrije natuur na verloop van tijd stoppen met eten waardoor ze sterven aan hongerdood. Om dit te voorkomen worden de dieren na de experimenten gedood.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt onderzoek naar reproductietechnologieën om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, het maximaal matige ongerief van 1957 juveniele alen en 2000 exogene voedende larven?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan een meer duurzame palingteelt in Nederland. Bij de ethische afweging is de DEC van mening dat het directe doel en het uiteindelijke doel ver uit elkaar liggen en dat het project ook bij kan dragen aan soortbehoud (ook een uiteindelijk ver weg liggend doel).
- De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:
- De proefdieren hebben een negatief welzijnsbelang van reëel morele waarde als gevolg van de handelingen in de experimenten. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
 - De palingen in het wild hebben een ecologisch voordeel van reëel morele waarde wanneer er minder glasaal gevangen hoeft te worden t.b.v. de commerciële palingkweek. Ook het niet in gevangenschap hoeven leven ziet de DEC als een belang van reële morele waarde
 - De palingen die gekweekt worden t.b.v. de commerciële palingkweek hebben geen voordeel.
 - De branchorganisatie/viskwekers hebben een groot commercieel belang van beperkte morele waarde wanneer zij gebruik kunnen maken van gekweekte glasaal en niet afhankelijk zijn van wildvang.
 - De onderzoekers, ^{5.1 lid2h} hebben een reëel wetenschappelijk belang van reële morele waarde.
 - Daarnaast heeft de ^{5.1 lid2h} een reëel economisch belang omdat het **5.1 lid2h** betreft. De DEC waardeert dit als een belang van geringe morele waarde.
 - Het ecosysteem heeft in de ogen van de DEC een belang van beperkte morele waarde bij minder vangst van wilde glasaal.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale palinglarven, die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet met maximaal matig ongerief voor maximaal 4134 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De DEC is van mening dat de haalbaarheid van het project groot is en dat het zeer zeker kennis zal opleveren. Echter, het is geen totaaloplossing.
- Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.
- De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op meerderheid van stemmen.
3. Onderstaande kanttekeningen zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
 - De DEC vraagt zich af of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot?
 - De onderzoeker heeft aangegeven dat men voor de commerciële houderij niet wil werken met veel hormoon- en antibioticagebruik zoals in het project gedaan wordt, maar de DEC vraagt zich af welk risico men loopt dat de praktijk toch op het onderzoek gaat lijken. Zij kan hier geen inschatting voor doen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e



Centrale Commissie Dierproeven

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL) |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
<input checked="" type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training
<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
<input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |
|-----|---|---|

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Aanleiding

Aanleiding voor deze aanvraag is de sterke achteruitgang van de Europese aal (of paling), wat de kwekers er toe heeft aangezet een duurzaam alternatief te willen ontwikkelen voor de onttrekking van glasaal (pootgoed) uit de natuurlijke populatie voor opkweek. Het sluiten van de productiecycclus van de paling kan zowel een duurzame aquacultuur realiseren als bijdragen aan een duurzaam natuurlijk bestand door het verlagen van de visserijdruk en mogelijk door uitzet. Het onderzoek naar vermeerdering van de aal onder geconditioneerde omstandigheden is in 2015 uitgezet door [5.1 lid2h](#)

[5.1 lid2h](#) produceert inmiddels drie keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dit project heeft het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Migrante soorten die net als de paling van belang zijn voor consumptie, maar waarbij het scheppen van kweekmogelijkheden ook van belang is voor instandhouding van de natuurlijke populaties.

Wat is er al bekend?

De Europese aal migreert éénmalig 6.000 km naar de Sargassozee om te paaien en vervolgens te sterven. Dit leiden we af uit twee feiten: in het najaar trekken puberende alen richting zee, en in het voorjaar zijn twee dagen oude larven aangetroffen in de Sargassozee (Schmidt, 1912, 1923). Op het moment dat ze in de zee verdwijnen zijn ze nog in een prepuberale staat en hebben de vrouwtjes een relatieve gonadenmassa (GSI) van max. 2%. Zo'n 6 maanden later in het voorjaar als ze volledig zijn afgerijpt in de Sargasso zee kan die GSI zijn opgelopen tot zo'n 60% (Palstra et al., 2005). Migrerende alen eten niet meer en vertrouwen dus volledig op hun energievoorraden voor succesvolle migratie en maturatie (afrijping). Na de paai zijn meer dan 70% van de energievoorraden uitgeput waarmee wordt aangenomen dat de alen sterven.

Er is echter nog nooit een afgerijpte paling gevonden in de Sargassozee, alle bestaande kennis van seksuele maturatie en reproductie komt uit het lab. Onderzoeksinspanningen hebben geregeld geleid tot larvenproductie maar het vóórkomen van larvale abnormaliteiten en sterften zijn hoog. Dit geldt ook nog altijd voor de Japanse aal waarvoor reeds een vijfde generatie is verkregen (Tsukamoto, 2019). Wel hebben de resultaten van de Japanse onderzoekers laten zien dat glasaal kan worden verkregen en de cyclus kan worden gesloten. Voor de Europese aal zullen dan eerst reproductietechnologieën moeten worden ontwikkeld voor de productie van vitale palinglarven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. De Japanse aal hoeft minder ver te zwemmen naar de paaigronden in de Marianentrog en is daarom minder moeilijk te reproduceren. Maar aangezien ze minder ver hoeven te zwemmen zijn ze ook minder vet en daarom niet geschikt voor de rokerij. Het onderzoek richt zich daarom op de Europese paling. Bovendien kampt men zelfs in de vijfde generatie van Japanse aal nog altijd met dezelfde problematische issues die we in ons onderzoek direct trachten op te lossen.

Gedurende de eerst vijf jaren [5.1 lid2h](#) hebben we een manier ontwikkeld om van pootaaltjes in 1,5 jaar goede ouderdieren te maken via feminisering, de juiste voeding en gesimuleerde migratie (Mes

et al., 2016): Een aanzienlijke generatieduur verkorting ten opzichte van wilde aal die tenminste 7 tot wel meer dan 50 jaar oud zijn. Deze gefeminiseerde alen, maar ook wilde schieralen, zijn succesvol tot afrijping gebracht via het gangbare protocol, en na innovaties in dat protocol zoals het gebruik van steroïd-implantaten en aal-specifieke recombinante gonadotropinen. Methodiek is ontwikkeld om in vitro oocyt maturatie te volgen en ovulatie-inducerende hormonen en doses te testen, als ook om eikwaliteit te kunnen beoordelen. Spontane afrijping is voor het eerst geobserveerd en wordt gemonitord (Palstra et al., 2020). Inmiddels worden drie keer per week larvenbatches geproduceerd die tot 25 dagen in leven blijven (Jéhannet et al., 2021). Parallel aan het toegenomen succes in larvenproductie wordt gewerkt aan het design van een hatchery-nursery om de juiste larvale condities te kunnen testen.

Door de ontwikkelde protocollen en de constante verbetering van die protocollen zijn we in staat om gecontroleerd larven te produceren met wilde glasaal als uitgangsmateriaal. Zo produceren we inmiddels twee keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dat kan worden geconcludeerd uit eibatches waarvan een groot deel zinkt of die niet leiden tot embryonale ontwikkeling; vertraging in het uitkomen van de eieren; sensitiviteit voor pathogenen; een diversiteit aan abnormale ontwikkelingen, en hoge mortaliteit, met name in de eerste week als larven van passief verticaal hangend in de waterkolom over moeten schakelen naar actief zwemmen en bijzonder gevoelig zijn voor beschadiging. Door deze lage vitaliteit krijgen we de larven nog niet tot exogene voeding en daarmee kunnen we nog niet de glasaal produceren waarmee we de productiecycclus kunnen sluiten. Om dat te bereiken heeft dit project het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven.

Referenties

- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Heinsbroek, L.T.N., Kruijt, L., Dirks, R.P., Swinkels, W., Komen, H. (2021) What goes wrong during early development of artificially reproduced European eel *Anguilla anguilla*? Clues from the larval transcriptome and gene expression patterns. *Animals* 11, 1710.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367–372.
- Palstra AP, Cohen EGH, Niemantsverdriet PRW, Van Ginneken VJT, Van den Thillart GEEJM (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1–4): 533–547.
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S. (2020) First observation of a spontaneously matured female European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific Reports* 10: 2339
- Schmidt, J. (1912) The reproduction and spawning places of the fresh-water eel (*Anguilla vulgaris*). *Nature* 89: 633-636.
- Schmidt, J. (1923) Breeding places and migration of the eel. *Nature* 111: 51-54.
- Tsukamoto K. (2019) Update Nihon University progression. 4th EELRIC workshop, Berlin, October 2019.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives
-

Onmiddellijk doel

Dit project heeft het specifieke doel om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, larven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. Het halen van dit doel is een fundamenteel biologische uitdaging die een integrale aanpak van expertises vereist om het oplossen van deze specifieke bottleneck in het sluiten van de productiecycclus mogelijk te maken.

Uiteindelijk doel

Het uiteindelijk doel is om een succesvolle kunstmatige reproductie van paling te bewerkstelligen dat zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in Nederlandse aquacultuurbedrijven. Het sluiten van de productiecyclus kan de aquacultuur voorzien van pootgoed en loskoppelen van de visserij op glasaal, om zodoende zowel een duurzaam natuurlijk bestand als duurzame aquacultuur te realiseren. De inspanningen van Japanse onderzoekers die de productiecyclus van de Japanse aal hebben gesloten en inmiddels een vijfde generatie hebben voortgebracht, kunnen de progressie voor de Europese aal accelereren.

Het beschreven onderzoek met als doel de productiecyclus van de paling te sluiten is een fundamenteel wetenschappelijke uitdaging. Het gebruik van hormonen om paling tot reproductie te brengen en antibiotica om larven te laten overleven stelt in staat deze processen te bestuderen. Vervolgens kan dan voor een toekomstige productie omgeving worden onderzocht hoe de hormonale interventies kunnen worden vervangen door gebruik te maken van natuurlijke triggers en hoe antibiotica weer kan worden vervangen door gebruik te maken van de microbiële samenstelling van gerijpt zeewater. Bovendien zal dat worden vergemakkelijkt door verdergaande domesticatie. En uiteindelijk zal het ouderdier dat tot reproductie wordt aangezet niet worden geconsumeerd, alleen de nakomelingen.

Wat gaat dit project opleveren?

Vitale larven kunnen tot voeden worden aangezet en opgroeien tot glasaal. Met het herhalen van het ontwikkelde protocol om van glasaal goede ouderdieren te maken zal de cyclus kunnen worden gesloten. Dat kan vervolgens concreet leiden tot bedrijfsmatige productie van glasaal in de Nederlandse aquacultuurbedrijven waarmee niet alleen een duurzaam voortbestaan van de sector wordt geborgd maar waarmee ook groei van de sector mogelijk wordt gemaakt. De glasaalvisserij, en algehele bevissing van de wilde populatie, wordt daarmee overbodig zodat de druk op de natuurlijke populatie wordt verminderd. De mogelijkheid om kunstmatig geproduceerde glasaal te gebruiken voor uitzetting kan onderzocht worden.

Succesvolle kunstmatige reproductie is een wereldwijde primeur. Het onderzoek sluit aan op een rijke historie en aanzienlijke track record binnen het palingreproductie onderzoek. De nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën en de gegenereerde kennis komt het visreproductie onderzoek naar andere, voor de aquacultuur belangrijke, maar lastig te reproduceren, iconische soorten als steur en tonijn, ten goede. Aangezien de problematiek voor het reproduceren van vissen in gevangenschap generiek is en vaak alleen verschilt in de levensfase waarin de onderdrukking van de reproductie plaats heeft (voor paling al voor aanvang van de puberteit) wordt verwacht dat de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën breder inzetbaar zijn dan voor paling alleen.

Subdoelen

Het beschreven doel wordt bereikt door zowel eikwaliteit als larvenvitaliteit te verbeteren.

De eikwaliteit zal worden verbeterd:

- door verfijning in conditionering van de ouderdieren;
- door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën;
- door het op grote schaal kunnen fenotyperen van de eikwaliteit.

De larven vitaliteit zal worden verbeterd :

- door aanpassingen in hatchery en nursery;
- door het achterhalen van de fysiologische mechanismen die van belang zijn voor larvale ontwikkeling en overleving;
- door het kunnen fenotyperen van de larvale kwaliteit.

Succesvolle larvale voedingsproeven zullen vervolgens aantonen dat bovenstaande subdoelen zijn bereikt. Het verbeteren van eikwaliteit en larvenkwaliteit zou zich moeten vertalen naar grote aantallen etende larven van goede kwaliteit. Daarmee zijn succesvolle voedingsproeven een validatie van de geboekte progressie.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We zijn nu in staat om met een serie houderij technieken (feminisatie, broodstock voeding, gesimuleerde migratie) van wilde glasaal goede vrouwelijke ouderdieren te maken in slechts 1.5 jaar, tenminste een 5x generatieduurverkorting. Zowel deze ouderdieren als wilde ouderdieren kunnen we nu sneller tot afrijping brengen en we hebben methodiek ontwikkeld om tot betere resultaten te komen. Inmiddels betaalt zich dat uit en kunnen we drie keer per week larvenbatches produceren, tot wel 100.000 larven per batch die tot 25 dagen in leven blijven. Ook de overleving hebben we weten te verbeteren door gebruik van antibiotica. Het traject van glasaal tot larve hebben we dus rond. Larvenkwaliteit voldoet echter nog niet om de laatste stap naar glasaalproductie te kunnen zetten en is de uitdaging voor nieuw onderzoek. Met de afgelopen 5 jaar aan opgebouwde kennis hebben we de juiste doelen voor dit project weten te stellen om de larvenvitaliteit te verbeteren en succesvol voedingsproeven te kunnen doen.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?[] No[X] Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

Aal is in 2007 in Appendix II in de CITES-lijst geplaatst. CITES is een internationaal verdrag tussen landen die de handel in diersoorten en planten beperkt. Appendix II houdt in dat de soort "niet noodzakelijkerwijs wordt bedreigd, maar dat het verstandig wordt geacht de handel te reguleren opdat die handel geen bedreiging vormt voor de soort en van daaruit maatregelen worden genomen die de handel in aal beperkt". Hierdoor mag er bijvoorbeeld geen export van Europese aal uit de EU zijn.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Technologisch

De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk en worden nieuwe aquacultuur sectoren leven ingeblazen. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.

Economisch

Succesvolle kunstmatige reproductie (en dus productie van glasaal) levert direct voordeel aan de 5.1 lid1c kweekbedrijven 5.1 lid2h, doordat zij dan kunnen bijdragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege de schaarste hoge prijzen kent. Dit neemt een belangrijke maatschappelijke zorg weg en stelt het bestaansrecht van de

ondernemingen veilig. De partners verwachten dat de resultaten uit het onderzoek zullen bijdragen aan een positievere beeldvorming op het gebied van consumptie van paling in Nederland. Er is een enorme markt in Nederland voor betaalbare palingproducten. Voor elke 1000 ton productie van paling komen er 100-150 arbeidsplaatsen bij. Door de beschikbaarheid van geproduceerde glasaal kan de productie aan de vraag worden aangepast.

Sociaal

Het publiek is gebaat bij behoud van de paling als gewilde consumptievis, de rijke cultuur en tradities die dat met zich meebrengt en de banen die gegenereerd zullen worden. Maar het publiek is ook gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecyclus en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid.

Ecologisch

Een gesloten productiecyclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluizen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

5.1 lid1c, 5.1 lid2h

Tenslotte kunnen ook de proefdieren; glasaal en schieraal uit de natuur en voedende larven uit eigen kweek, worden beschouwd als stakeholders binnen dit project. De paling zelf heeft baat bij het verlagen van de visserijdruk op de natuurlijke populatie, het verbeteren van dierenwelzijn en het verhogen van de vitaliteit van de larven.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Stimulering van afrijping

Wilde glasaal is nog altijd het uitgangsmateriaal voor een gesimuleerde levenscyclus waarin we in 1,5 jaar goede moeders kunnen maken via feminisering (Chai et al., 2010), de juiste voeding en gesimuleerde migratie (Mes et al., 2016). Met wilde vrouwelijke schieralen als positieve controles worden ze tot afrijping gebracht door hypofysatie (wekelijkse injecties met hypofyse extract - CPE) toe te passen (Palstra et al., 2005). Tenslotte wordt de ovulatie geïnduceerd met een DHP (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) injectie. Wilde mannelijke schieralen kunnen met een enkele hCG (human chorionic gonadotropin) injectie tot afrijping worden gebracht waarna een tweede injectie zorgt voor goed kwaliteitssperma. Ouders worden gestript, eieren worden bevrucht en vervolgens gevolgd in hun ontwikkeling na uitkomen van de eieren. Ondermaatse vitaliteit van de larven voorkomt de volgende stap om de larven op voer te krijgen vanaf 15 dagen na uitkomen van de eieren onder de huidige condities. Die step is essentieel in de productie van een eerste generatie glasaal dat uitgangsmateriaal vormt voor het sluiten van de productiecycclus.

Eikwaliteit

Om vitale larven te verkrijgen zal allereerst de eikwaliteit verbeterd moeten worden. Dat kan enerzijds door verfijning in conditionering van de ouderdieren. [5.1 lid2f](#)

Anderzijds kan de eikwaliteit verbeterd worden door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën. [5.1 lid2f](#)

Nachtelijke paai activiteiten zullen worden gemonitord door toepassing van accelerometer sensoren. Tot slot moet eikwaliteit gefenotypeerd kunnen worden om uitspraken te kunnen doen over de kwaliteit van de betreffende eibatch, het succespercentage te kunnen voorspellen en mogelijk zelfs tot selectie van goede eieren over te kunnen gaan. [5.1 lid2f](#)

Larvenvitaliteit

Naast verbetering van de eikwaliteit, kan verbetering van de larvale vitaliteit allereerst bereikt worden door aanpassingen in hatchery en nursery condities. Optimalisaties zullen niet alleen voor paling van belang zijn maar ook voor andere pelagische vissoorten die miljoenen eieren kunnen afzetten maar met minimale investering in elk van die eieren zodat de larven zeer kwetsbaar zijn (bv. tonijn- en makreelsoorten). Kweeksystemen voor elk van de opvolgende fasen (eieren; vroege inactieve larven; actieve en voedende larven in Kreisel tanks - Okamura et al., 2009) moeten constant worden geoptimaliseerd om aan de eisen van de larven tegemoet te komen. Temperatuur, licht en saliniteit spelen een belangrijke rol (Politis et al., 2014, 2017, 2018) en waarschijnlijk geldt dat ook voor dichtheden, waterkwaliteitsparameters en zuurstofgehalten. De aanzienlijke kennis en ervaring met opkweek van mariene soorten binnen [5.1 lid2h](#) zal bijdragen aan het innoveren en optimaliseren van de kweeksystemen.

Fenotypering van de larvale kwaliteit en bestudering van de fysiologische mechanismen die een rol spelen in de larvale ontwikkeling en overleving zal moeten plaatshebben om de origine van abnormaliteiten in kaart te kunnen brengen. Bovendien kan die larvenkwaliteit vervolgens worden geassocieerd met afkomst, eikwaliteit, kweeksystemen en -condities zodat er ook naar oplossingen gestreefd kan worden. 5.1 lid2f

Tenslotte zullen alle maatregelen voor het verhogen van de ei- en larvenkwaliteit zich moeten bewijzen in exogeen voedende larven. 5.1 lid2f

Zeer recentelijk zijn ook al groepen larven van de Japanse aal tot glasaal opgekweekt met een dieet gebaseerd op gangbare conventionele mariene ingrediënten (Masuda et al., 2016). Naast de samenstelling van de diëten is ook de vorm (partikels of pasta; textuur) en de wijze van aanbieding (verspreid in het water of lokaal als aggregaat) van belang. 5.1 lid2f

Dit vertaalt zich in specifieke taken (T) met elk eigen mijlpalen of 'milestones' (M):

5.1 lid2f

5.1 lid2f

Referenties

- Chai Y., Tosaka R., Abe T., Sago K., Sago Y., Hatanaka E., Ijiri S. and Adachi S. (2010) The relationship between the developmental stage of oocytes in various seasons and the quality of the egg obtained by artificial maturation in the feminized Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture Sci.* 58, 269-278.
- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Giménez Nebot, I., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Komen, H. (2021a) First European eel larvae produced using recombinant FSH and LH - in vivo and in vitro effects on oocyte maturation and reproductive success. *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.
- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Heinsbroek, L.T.N., Kruijt, L., Dirks, R.P., Swinkels, W., Komen, H. (2021b) What goes wrong during early development of artificially reproduced European eel *Anguilla anguilla*? Clues from the larval transcriptome and gene expression patterns. *Animals* 11, 1710.
- Masuda, Y., Yatabe, T., Matsunari, H., Furuita, H., Kamoshida, M., Shima, Y., Kuwada, H. (2016) Rearing of larvae of Japanese eel *Anguilla japonica* to metamorphosis into glass eel by feeding with fish protein hydrolysate-based diets. *Nippon Suisan Gakkaishi* 82(2): 131-133.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367-372.
- Miller, M.J., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Yamada, Y., Tsukamoto, K., Ohkouchi, N. (2013) A low trophic position of Japanese eel larvae indicates feeding on marine snow. *Biol. Lett.* 2013 9, 1-5.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y. (2007) Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. eds. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer pp. 437-476.
- Nguyen AT, Chia JHZ, Kazeto Y, Wylie MJ, Lokman PM. (2020) Induction of oocyte development in previtellogenic eel, *Anguilla australis*. *General and Comparative Endocrinology* 291, 113404.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Tanaka, S., Kobayashi, H., Tsukamoto, K. (2013) Hen egg yolk and skinned krill as possible foods for rearing leptocephalus larvae of *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. *Aquaculture Research* 44, 1531-1538.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horita, T., Horie, N., Mikawa, N., Utoh, T., Tanaka, S., Tsukamoto, K. (2009) Rearing eel leptocephali (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) in a planktonkreisel. *Aquaculture Research* 40, 509-512.
- Palstra, A.P., Bouwman, L.J., Jéhannet, P., Kruijt, L., Schipper, H., Blokland, M.H., Swinkels, W.S., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M. (2021) 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol implant effects on the induction of vitellogenesis in feminized European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.
- Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S. (2020) First observation of a spontaneously matured female European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific Reports* 10: 2339
- Politis SN, Butts IAE, Tomkiewicz J (2014) Light impacts embryonic and early larval development of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 461, 407-415,
- Politis SN, Mazurais D, Servili A, Zambonino-Infante J-L, Miest JJ, Sørensen SR, et al. (2017) Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS ONE* 12(8): e0182726.

Politis SN, Mazurais D, Servili A, Zambonino-Infante J-L, Miest JJ, Tomkiewicz J, et al. (2018) Salinity reduction benefits European eel larvae: Insights at the morphological and molecular level. PLoS ONE 13(6): e0198294.
 Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), Eel Biology, Springer, Heidelberg pp. 427–434.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

In de afgelopen vijf jaar hebben we uitstekende onderzoeksfaciliteiten weten te realiseren. We hebben de conditionering van ouderdieren verbeterd zodat we in 1,5 jaar van juveniele glasaaltjes goede ouderdieren kunnen maken die gewend zijn aan hanteren en houderij. Hiermee zijn we niet meer afhankelijk van wilde ouderdieren die tenminste 7 tot wel 50 jaar oud zijn, stress hebben door vangst en transport, ziektes meebrengen en soms hoge mortaliteit vertonen. Daardoor kunnen we nu zowel larven produceren van wilde alen als van geconditioneerde alen met gelijke efficiëntie. Inmiddels produceren we twee keer per week gecontroleerd tot wel 100,000 palinglarven die tot 25 dagen in leven blijven. Ei- en larvenkwaliteit is echter nog laag en zeer variabel. Embryo mortaliteit is hoog en hatching percentages zijn laag. Na 15 dagen zouden de larven in staat zijn om te gaan eten maar ook de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats, ze overleven de eerste week niet en/of ze vertonen afwijkingen/misvormingen. Om de larven tot exogeen voeden aan te zetten zullen we op dat moment nog duizenden vitale larven moeten hebben aangezien voedingsgedrag dichtheid-afhankelijk lijkt. Een uitgebreidere beschrijving is toegevoegd als de bijlage "kennis, innovaties en tools vanuit het internationaal paling reproductie onderzoek en het 5.1 lid2h periode 2016-2021" onder documenten.

Hoewel taken elkaar opvolgen in het reproductieproces kunnen ze onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Het uitvoeren van een volgende taak is dus niet specifiek afhankelijk van het succes van een eerdere taak. Er is dus geen sprake van go/no go momenten, alleen momenten waarin wordt afgewogen of een innovatie wel of niet onderdeel wordt van het standaard reproductieprotocol.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven
2	Monsterafname van voedende larven



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Appendix 1 betreft de stimulatie van ouderdieren voor productie van eieren en larven. Ouderdieren betreffen hier gefeminiseerde en wilde vrouwelijke ouderdieren en mannelijke wilde ouderdieren. Stimulatie betreft het traject van schieraal tot gematureerde aal, het tot afrijping brengen. Enerzijds brengen we dieren tot afrijping om zo eieren en larven te produceren om daaraan te meten. Anderzijds proberen we de eikwaliteit te verbeteren door verfijning in de conditionering van de ouderdieren, en door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën. Die testen worden in de tijd herhaald om zo verder te kunnen optimaliseren.

Vrouwelijke schieralen worden tot afrijping gebracht door hypofysatie (wekelijkse intramusculaire injecties van hypofyse extract) toe te passen (Palstra et al., 2005). Tenslotte

wordt de ovulatie geïnduceerd met een 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) injectie. Wilde mannelijke schieralen kunnen met een enkele hCG (human chorionic gonadotropin) injectie tot afrijping worden gebracht waarna een tweede injectie zorgt voor goed kwaliteitssperma. Het afrijpen van de vrouwtjes wordt geïnduceerd door een toename in het gewicht vanwege een hydratatie respons van de oocyten. Zodra gewichtstoename meer dan 20% bedraagt wordt de finale maturatie en ovulatie geïnduceerd. Gameten van mannetjes en vrouwtjes worden vervolgens afgestroken en bevrucht.

5.1 lid2f

Overige dieren worden dan tot afrijping gebracht om vervolgens reproductiesucces (aantal injecties tot maturatie, eikwaliteit, larvenvitaliteit) te kunnen correleren aan behandeling. 5.1 lid2f

Primaire uitkomstparameters betreffen gonadenhistologie, hormoonniveaus en genexpressie langs de reproductieve as hypothalamus-hypofyse-lever-gonaden. De parameters die worden gemeten stellen de onderzoekers in de staat de maturatie status vast te stellen en daarmee verschillen tussen groepen ten aanzien van de gestelde vraag te kunnen duiden. De proef is geslaagd als de vraag, positief of negatief, beantwoord kan worden. Gonadenmassa wordt bepaald door tijdens de dissectie beide gonaden te wegen. In relatie tot het lichaamsgewicht geeft dit de GSI. Gonadenhistologie zal in staat stellen het ontwikkelingsstadium te duiden. Hormoonniveaus in de gonaden, met name van androgene en oestrogene steroïden, en enzymen als aromatase die omzetting realiseren, worden gemeten (ELISA en/of RIA) en de genexpressie van aromatase en steroïdreceptoren wordt dan bepaald. Circulerende hormoonniveaus worden bepaald in plasma en genexpressie wordt bepaald (qPCR en/of RNAseq) in de gonaden en langs de reproductieve as hypothalamus (e.g. Gonadotropin Releasing Hormone - GnRH) - hypofyse (e.g. LH, FSH) - lever (e.g. oestradiol receptor, vitellogeninen).

5.1 lid2f

Reproductiesucces zal worden gecorreleerd aan de behandelingen. 5.1 lid2f

Incidentele gevallen van spontane maturatie en natuurlijke paai zullen worden gemonitord.

Aangezien de onderzoeksfocus in dit project ligt op eikwaliteit en larvenvitaliteit is het grootste deel van de experimentele wilde ouderdieren vereist voor productie van eieren en larven.

5.1 lid2f

De hatching assays zijn wells platen waarin een 100 tal individuele eieren wordt gehouden om zo percentueel te kunnen bepalen welke eieren wanneer stoppen met ontwikkelen en welke uiteindelijk uitkomen (hatchen). 5.1 lid2f

5.1 lid2f

De vitaliteit van individuele larvenbatches wordt bepaald door inschatting van aantallen, bepaling van mortaliteit en monitoring van deformaties. De vitaliteit wordt gekoppeld aan het type systeem en de condities, aan de aanpassingen in beiden en experimentele behandelingen met antibiotica, desinfectie methoden en verlaging van saliniteit. Net als voor de eikwaliteit zullen we larvale kwaliteit karakteriseren door histologische en fysiologische bestudering.

Succesvolle verbetering van eikwaliteit en larvenvitaliteit zal zich uiten door het produceren van tenminste 5000 larven zonder abnormaliteiten op dag 15 wanneer met exogeen voeden zou moeten worden begonnen. Monsterafname van deze voedende larven wordt beschreven in appendix 2.

Referenties

Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547.

Palstra, A.P., Bouwman, L.J., Jéhannet, P., Kruijt, L., Schipper, H., Blokland, M.H., Swinkels, W.S., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M. (2021) 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol implant effects on the induction of vitellogenesis in feminized European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Bij aanvang van hormonale stimulatie zullen alle vrouwelijke alen éénmalig verdoofd worden en geïnjecteerd worden met een PIT ID tag (Trovan). Vervolgens vinden biometrische metingen plaats (lengte, gewicht, lichaamsomtrek en oogdiameters).

In het geval dat dieren deel uitmaken van een steroid implantaat of hCG test wordt ook een

5.1 lid2f

5.1 lid2f

5.1 lid2f

5.1 lid2f

Referenties

Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547.

Sørensen, S.R., Tomkiewicz, J., Munk, P., Butts, I.A.E., Nielsen, A., Lauesen, P., Graver, C (2016) Ontogeny and growth of early life stages of captive-bred European eel. *Aquaculture* 2016, 456, 50–61

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Bepaling van het aantal dieren per groep (voor dissectie en monsterafname) is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiële reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	89 - Other Fish*	05	juveniel	1600	vrouw	nvt	nvt
2	89 - Other Fish*	05	juveniel	534	man	nvt	nvt

Provide justifications for these choices

Species

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla* aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort.

Origin

5.1 lid2f

Life stages

De juvenielen worden in de eigen faciliteiten opgekweekt to broodstock dieren. De wilde broodstock dient als positieve controle en als uitgangsmateriaal voor ei- en larvenproductie aangezien reproductief success hoger ligt.

Number

De meest recente resultaten over 2021 laten zien dat we inmiddels 84% van de vrouwtjes paling waarmee we de stimulatie starten tot volledige maturatie kunnen brengen. Van 77% van deze dieren krijgen we eieren en van 57% larven. Deze percentages zijn als uitgangspunt genomen voor de bepaling van de aantallen benodigde dieren in deze aanvraag. Voor dissectie wordt N=10 aangehouden zoals beargumenteerd onder A. Voor het aantal vrouwen per taak geldt:

5.1 lid2f

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

5.1 lid2f

In totaal zijn dus 1600 vrouwelijke dieren en 534 mannelijke dieren nodig:

TAAK	experimentele dieren		larven
	vrouwtjes	mannelijke	
T1.a-1	224		
T1.a-2	224		
T1.a-3	108		
T1.b-1	108		
T1.b-2	108		
T1.b-3			
T1.c-1	18		
T1.c-2	54		
T2.a-1			
T2.a-2	144		
T2.a-3	72		
T2.b-1			
T2.b-2	180		
T2.c-1			
T2.c-2			
T2.c-3	360	534	2000
totaal	1600	534	2000

Gender
Zowel mannen als vrouwen zijn nodig voor de productie van nakomelingen.

Genetic alterations
nvt

Strain
nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Dieren kunnen ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Stress tgv hanteren; éénmalige of wekelijkse injectie met hormonen, implantaten of van een PIT tag; bloedafname; het afstrijken van gameten.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Goede dierverzorging tracht effecten te minimaliseren. Verdoving wordt toegepast voorafgaand aan meting en behandeling.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Licht ongerief door het vangen en licht verdoven; het meten en wegen; de stress die optreedt door hanteren; het injecteren; en het doden. Bij bloedafname en het geven van 12 of meer wekelijkse injecties wordt ingeschat dat het cumulatieve ongerief matig is. Dit geldt voor 36% van de vrouwelijke dieren, bij overige dieren wordt geen bloed afgenomen en/of is het aantal wekelijkse injecties lager dan 12. Mannelijke dieren ondervinden licht ongerief van de twee injecties die in totaal worden toegediend en het afstrijken van gameten. De experimentele opstellingen zelf leveren geen of onderdrempelig ongerief.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen.

Reduction

In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.

Refinement

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zal de seksuele maturatie en reproductie als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol. Door toepassing van de langzaam uitlekkende hormoonpreparaten hebben we het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes (en daarmee ook het wekelijkse verdoven en hanteren) weten te reduceren van gemiddeld 14 naar 8. Voor de mannetjes geldt een bestaand protocol van wekelijkse injecties (tenminste 10) die we hebben kunnen vervangen door 2 injecties. Indien we meer kennis verzamelen over het natuurlijk stimuleren van de maturatie zullen injecties verder, of zelfs geheel, kunnen worden ingeperkt.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

nvt

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment**K. Destination of the animals**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Dieren worden ge-euthanaseerd door een overdosis phenoxy ethanol.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Voor de andere dieren geldt dat schieralen niet meer eten en dus uiteindelijk zullen sterven als ze niet onmiddellijk worden ge-euthanaseerd.



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Monsterafname van voedende larven

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Tenslotte zullen alle maatregelen voor het verhogen van de ei- en larvenkwaliteit zich moeten bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Daartoe zullen we larvale voedingsproeven doen met batches die hoge overleving vertonen, weinig abnormaliteiten vertonen en een hoge vitaliteit kennen op 15 dagen na hatching. Optimale diëten en voedingsystemen zullen daarvoor worden ontworpen.

Appendix 2 betreft de monsterafname van voedende larven, larven die actief zwemmen en voeding-zoekend gedrag vertonen vanaf dag 15 na uitkomen van het ei onder de huidige condities en succesvol foerageren op aangeboden voeding.

Voor deze taak kan een batch goede kwaliteitslarven op dag 15 worden opgesplitst om diverse diëten te testen, en vervolgens te optimaliseren. Daarbij wordt gedacht aan tenminste 5,000 vitale larven per batch. Hoeveelheden larven in een batch of bekerglas worden ingeschat op

basis van dichtheid. In dat geval zouden 5 diëten op elk 1,000 larven kunnen worden getest. 5.1 lid2f

Respons en voedingsgedrag voor elk van die diëten zal worden gemonitord. Monsters zullen worden genomen om de larvale ontwikkeling te bestuderen. Die monsters worden genomen om een ontwikkelingsreeks in kaart te brengen van de start van exogeen voeden tot metamorfose naar glasaal hetgeen wordt verwacht op 200 tot 250 dagen na hatching.

Referenties Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), Eel Biology, Springer, Heidelberg pp. 427–434.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

5.1 lid2f

Zodra we larven op voer kunnen krijgen zullen monsters genomen worden en moet dit worden betiteld als dierproef. Larvenmonsters worden microscopisch onderzocht en gepreserveerd in formaline en RNA later voor histologisch en (in situ) genexpressie onderzoek.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Bepaling van het aantal dieren per groep (hier het aantal gemonsterde larven per tijdstip) is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	89 - Other Fish*	05	larvaal	2000	nvt	nvt	nvt

Provide justifications for these choices

Species

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla* aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort.

Origin

Herkomst betreft eigen kweek.

Life stages

De proefdieren zijn voedende larven die gemonsterd worden.

Number

Voor het testen van diëten wordt uitgegaan van 10 goed larvenbatches die worden geproduceerd van elk tenminste 5,000 larven. Nog eens 10 batches worden gebruikt voor monsterafname bestaande uit 10 tijdstippen: 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150 en 200 dagen na hatching. Voor elk tijdstippen worden 10 larven gemonsterd in twee diverse media – formaline en RNAlater) die worden gebruikt voor de monsterafnames. Larven die voedingzoekend gedrag vertonen maar niet eten worden ook in leven worden gehouden tot max. 18 dagen.

Zodoende zijn in totaal 2,000 voedende larven vereist (10 batches x 10 tijdstippen x 10 larven x 2 media – formaline en RNAlater) die worden gebruikt voor de monsterafnames. Larven die voedingzoekend gedrag vertonen maar niet eten worden ook in leven worden gehouden tot max. 18 dagen.

Er is dus sprake van twee aantallen. Allereerst moet op dag 15 sprake zijn van een batch van 5000 larven om een voedingsexperiment te kunnen doen. Dan worden per batch vervolgens max 2000 larven in een reeks gesampeld.

Gender

nvt

Genetic alterations

nvt

Strain

nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Dieren kunnen ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdooving.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten. De professionele diervverzorgers zorgen voor optimale systeem omstandigheden en waterkwaliteit condities. Bovendien monitoren ze de larven dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Larven hangen in eerste instantie verticaal in de waterkolom. Larven die dan in cirkeltjes zwemmen zijn afwijkend en worden ge-euthanaseerd. Later vertonen de larven actief zwemgedrag, afwijkende larven zouden dan sterven.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Simulatie niet mogelijk, alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.

Reduction

In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.

Refinement

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Ook hier zal elke vorm van stress nadelig zijn voor het experimentele resultaat. Er wordt geen ongerief verwacht.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.
nvt

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Euthanasie voor monsterafname. Overige larven worden verder opgegroeid.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Overdosis verdoving met phenoxy ethanol.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

nvt

Naam van het project	Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)
NTS-identificatiecode	NTS-NL-961098 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	paling voortplanting eikwaliteit vislarven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Ethologie/diergedrag/dierbiologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Dierenwelzijn

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Het sluiten van de productiecycclus van de paling kan zowel een duurzame aquacultuur realiseren als bijdragen aan een duurzaam natuurlijk bestand. In het 5.1 lid 2h produceren we inmiddels drie keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dit project heeft het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Migrante soorten die net als de paling van belang zijn voor consumptie, maar waarbij het scheppen van kweekmogelijkheden ook van belang is voor instandhouding van de natuurlijke populaties.</p> <p>De innovatieve technologieën zijn gericht op verbetering van de eikwaliteit door verfijning in conditionering van de ouderdieren; optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën, en typering van de eikwaliteit. Maar ook direct op verbetering van de larvenvitaliteit door aanpassingen in opgroeicondities; typering van de larvale kwaliteit en bestudering van de fysiologische mechanismen achter larvale ontwikkeling en overleving, en tenslotte formulering van optimale diëten, ontwerpen van voedingssystemen en ultieme bewijsvoering door het doen van larvale voedingsproeven.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).</p>	<p>De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.</p> <p>Het publiek is gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid. Een gesloten</p>

productiecyclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluisen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Vrouwtjespaling wordt tot afrijping gebracht door wekelijkse hormooninjecties (8-14 injecties met hypofyse extract). Bij gewichtstoename zullen dieren worden gewogen om te bepalen of de eitjes opzwellen (max 8 keer), uiteindelijk zal ook een biopsie worden genomen om het ontwikkelingsstadium te bepalen. Als dieren klaar zijn om af te rijpen krijgen ze een extra injectie met hypofyse extract en een injectie met een hormoon om de ovulatie te stimuleren waarop dieren eitjes gaan afgeven. Getest wordt of deze periode kan worden ingekort en of de eikwaliteit kan worden verbeterd door gebruik van palingspecifieke hormonen of eenmalige injectie van hormoonimplantaten. Dieren worden dan doorgemeten op externe en interne kenmerken (door het maken van een echo) en een deel van de dieren wordt gebruikt voor dissectie. Mannetjes worden tot afrijping gebracht door een eenmalige injectie met hCG (human chorionic gonadotropin). Bij het afgifte van sperma ontvangen ze nog een injectie ter verhoging van de spermakwaliteit. Tenslotte worden de eitjes en sperma van mannetjes en vrouwtjes afgestreken en bevrucht. Daartoe wordt de buikholte licht gemasseerd richting cloaca. Ontwikkende eitjes komen uit en de larven ontwikkelen dan door tot 15 dagen na uitkomen. Dan zouden larven kunnen eten en wanneer ze dat doen zullen larven worden gemonsterd om de ontwikkeling te bestuderen.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Ouderdieren kunnen stress ondervinden tgv hanteren; éénmalige of wekelijkse injectie met hormonen, implantaten of van een PIT tag ('Passive Integrated Transponder', een kleine implanteerbare transponder voor individuele identificatie); bloedafname, en het afstrijken van gameten. Bij alle handelingen worden dieren licht verdoofd. Voedende larven ondervinden licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Andere vissen (other Pisces)</td> <td>4144</td> <td>0</td> <td>3568</td> <td>576</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Andere vissen (other Pisces)	4144	0	3568	576	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Andere vissen (other Pisces)	4144	0	3568	576	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren worden gedood voor dissectie of monsterafname. Overige dieren worden na gebruik ook gedood omdat schieralen niet meer eten en zodoende uiteindelijk zouden sterven. Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om uiteindelijke dood voorkomen.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen. Ook zijn alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zullen de seksuele maturatie, reproductie en larvale ontwikkeling als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>De experimentele vissoort betreft de Europese aal <i>Anguilla anguilla</i> aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort. De stadia betreffen afrijpende ouderdieren (schieralen) en voedende larven.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

Datum 10 mei 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215973

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitaAL)
 Aanvraagnummer: AVD202215973
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek
 Behoud van de soort

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's


Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none"> - In uw projectvoorstel geeft u onder 2.1 drie doelcategorieën weer (fundamenteel, translationeel en behoud van diersoort). In de NTS geeft u maar twee doelcategorieën aan (fundamenteel en translationeel). Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen? - U heeft in bijlage 1 van de dierproeven het cumulatieve ongerief per geslacht weergegeven. Kunt u in deze bijlage aangeven wat het cumulatieve ongerief van het totaal aantal dieren is? - In bijlage 2 van de dierproeven geeft u onder K aan dat de overige larven verder worden opgegroeid. Dat er dieren de proef zouden overleven is niet terug te lezen in de NTS. Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen? <p>De volgende vragen zijn gesteld over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - In de NTS noemt u 5.1 lid2h De NTS dient anoniem te zijn. Kunt u de naam van de instelling uit de NTS verwijderen? - In de NTS gebruikt u 3. moeilijke woorden 4. vakjargon die voor een algemeen publiek lastig te volgen zijn. Kunt u de woorden vereenvoudigen zodat de NTS ook voor leken te lezen is? - In de NTS onder het tabblad 'expected harms' heeft u drie keer de categorie other fish gebruikt. Voor het publiceren op de Europese website mag elke categorie op dit tabblad maar een keer zijn ingevuld. Kunt u
--------	--


Overzicht van opmerkingen bij 10. AdviesNotaCCD - 5.1 lid2e 5.2 lid1 _nog beveiligd.pdf


Pagina: 1

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 12-5-2022 16:06:19

5.2 lid1

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 16:08:11
Deze vraag hangt dus of of dat doel valide is...

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 12-5-2022 15:32:52
weglaten

 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 12-5-2022 15:42:58
mag ook weg, zo snappen ze het denk ik wel ;)

Je zou nog een paar voorbeelden kunnen geven om ze te helpen, maar hoeft niet hoor.

	deze aantallen bij elkaar optellen en een keer weergeven onder deze categorie?			
	<p>@SVEN: uit bijlage 2: Er is dus sprake van twee aantallen. Allereerst moet op dag 15 sprake zijn van een batch van 5000 larven om een voedingsexperiment te kunnen doen. Dan worden per batch vervolgens max 2000 larven in een reeks gesampeld. Deze 5000 zijn toch zelf voldoende. Moeten er dan niet 5000 larven worden aangevraagd?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven				
	Andere vissen (andere Pisces)	Europese aal	2.134	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn Dieren in/uit het wild Bedreigde dieren
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven				
	Andere vissen (andere Pisces)	Europese aal (larvaal)	2.000	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Bedreigde dieren

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

In bijlage 1 van de dierproeven gebruikt men dieren uit een palingkwekerij en dieren uit het wild.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C6: Voor zover de DEC dat kan inschatten en zoals uit de antwoorden van de onderzoeker blijkt is de DEC niet unaniem van mening dat er geen aanleiding is om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. Met name één van de DEC-leden houdt zorg over de verontreiniging van het afvalwater en is
-------------------	--

Pagina: 2

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 16:03:38

De vraag is of ze ook handelingen ondergaan (doden voor weefsels) waardoor het een dierproef wordt. 5.2 lid1
5.2 lid1

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 16:01:35

Nog even de vraag en het antwoord over hormonen toevoegen:

De DEC vraagt zich af wat er met het afvalwater uit het project gebeurt. Dit is verontreinigd met o.a. antibiotica en hormonen.

Wij verwachten geen verontreiniging van afvalwater met hormonen. Gonadotropines hebben een zeer korte halfwaardetijd (minuten) en spelen dan geen rol. De halfwaardetijd van steroïden is langer (uren-dagen) maar de verontreiniging is niet significant. Collega's van de Leiden Universiteit hebben estradiol gemeten in het afvalwater van estradiol gevoerde paling maar die niveaus waren lager als in het tapwater. Overigens scheiden de maturerende vissen zelf ook op natuurlijke wijze hormonen af dus een onderscheid is niet of nauwelijks te maken.

Antibiotica wordt gebruikt in zeer lage hoeveelheden aangezien de watervolumes waarin de eieren en larven worden gehouden laag zijn. Vervolgens wordt door verdunning van het afvalwater de verontreiniging zeer beperkt.

Aangezien er ja of nee moet worden beantwoord is er met 'nee' beantwoord onder 'adverse environmental effects') hetgeen geen ruimte biedt om verdere uitleg toe te voegen.

van mening dat de onderzoekers hier te lichtzinnig over denken. Ook al wordt de antibiotica in het afvalwater zeer verdund en is het risico van verontreiniging zeer beperkt, het risico is er wel! Ook de korte halfwaardetijd van de hormonen is wat dit DEC-lid betreft onvoldoende reden om de effecten op het milieu niet in twijfel te trekken. Ook na een korte halfwaardetijd blijft de andere helft nog onveranderd aanwezig en hoe het dan is afgebroken kan op zichzelf ook schadelijk zijn. (Bekend is dat het eten van vlees van dieren die met hormonen zijn behandeld ook na de wachttijd toch schadelijk is). Dit DEC-lid geeft aan dat het als voorwaarde voor vergunning graag ziet dat het afvalwater in voldoende mate gezuiverd wordt voordat het in het afvalwatersysteem geloosd wordt.

Citaat C8: De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Echter, de DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica. Hoewel de onderzoekers aangeven dat het niet de bedoeling is dat dit voor de praktijk ontwikkeld zal worden is het blijkbaar op dit moment wel noodzakelijk om preventief antibiotica in te zetten om de larven in leven te houden. De verleiding is dan ook groot om bij succes in productie van glasaal, dit in stand te houden, mochten er geen alternatieven te bewerkstelligen zijn. Ook het gegeven, dat de onderzoeker een aantal verschillende antibiotica wil testen stemt de DEC niet hoopvol. Als je uiteindelijk toe wil naar een antibioticavrije productie van glasaal, lijkt de DEC de start hiernaar essentieel. Echter, het betreft hier ook wetenschappelijk onderzoek (in een kleine setting) in het hele traject van reproductie-ei-larve-glasaal. Op die gronden is de insteek van de onderzoeker te billijken, ondanks het gebruik van antibiotica, wat tot nu toe het enige is, dat succesvol blijkt in de overleving van glasaal, om ook tevens onderzoek te doen naar de ontwikkeling van ei tot glasaal. De DEC zou liever zien dat de onderzoeker op basis van Good Veterinary Practice antibiotica therapeutisch inzet en dus eerst diagnostiek bedrijft en aan de hand daarvan een keuze maakt voor meest effectieve antibiotica. Verder zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting.

Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4), paling staat op de Europese rode lijst

□ Dieren in/uit het wild (10f)

□ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Op dit moment is palingkweek van Europese aal in gevangenschap nog niet mogelijk dus moeten glasaaltjes uit het wild gebruikt worden. De dieren uit bijlage 1 worden gebruikt in bijlage 1, maar de DEC vraagt zich af of dit als hergebruikt geclassificeerd moet worden.

Citaat C13: Er zijn geen proefgerelateerde humane eindpunten, hoewel er (net als in de natuur) veel spontane ziekten optreedt. Er wordt bij zichtbare gezondheidsproblemen volgens GVP (Good Veterinary Practice) gehandeld

Citaat C14: De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er zijn geen alternatieven om deze proeven zonder dieren uit te voeren. Er is wel een maatschappelijk alternatief: paling wordt gezien als een luxeproduct (vergelijk bont/nertsenhouderij) en niet een noodzakelijke voedselbron. Stoppen met eten van paling zou dit soort onderzoek overbodig maken.

Citaat C18: De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is: voor het bereiken van de doelstellingen van het onderzoek zijn meer vrouwelijke dan mannelijke dieren nodig.

Citaat C20: Op een vraag van de DEC over hergebruik van de dieren heeft de onderzoeker geantwoord dat de dieren, analoog aan de vrije natuur na verloop van tijd stoppen met eten waardoor ze sterven aan hongerdood. Om dit te voorkomen worden de dieren na de experimenten gedood.


Ethische afweging van de DEC:


Citaat:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt onderzoek naar reproductietechnologieën om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, het maximaal matige ongerief van 1957 juveniele alen en 2000 exogene voedende larven?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan een meer duurzame palingteelt in Nederland. Bij de ethische afweging is

Pagina: 4

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 12-5-2022 15:45:35
nee, in bijlage 1 ondergaan ze geen handelingen

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:46:21
tegen spotane sterfte hoeven geen HEps te worden opgesteld, die zijn enkel van toepassing op proefhandelingen

de DEC van mening dat het directe doel en het uiteindelijke doel ver uit elkaar liggen en dat het project ook bij kan dragen aan soortbehoud (ook een uiteindelijk ver weg liggend doel).

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren hebben een negatief welzijnsbelang van reëel morele waarde als gevolg van de handelingen in de experimenten. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
- De palingen in het wild hebben een ecologisch voordeel van reëel morele waarde wanneer er minder glasaal gevangen hoeft te worden t.b.v. de commerciële palingkweek. Ook het niet in gevangenschap hoeven leven ziet de DEC als een belang van reële morele waarde
- De palingen die gekweekt worden t.b.v. de commerciële palingkweek hebben geen voordeel.
- De branchorganisatie/viskwekers hebben een groot commercieel belang van beperkte morele waarde wanneer zij gebruik kunnen maken van gekweekte glasaal en niet afhankelijk zijn van wildvang.
- De onderzoekers, ^{5.1 lid2f} hebben een reëel wetenschappelijk belang van reële morele waarde.
- Daarnaast heeft de ^{5.1 lid2f} een reëel economisch belang omdat het contract research onderzoek betreft. De DEC waardeert dit als een belang van geringe morele waarde.
- Het ecosysteem heeft in de ogen van de DEC een belang van beperkte morele waarde bij minder vangst van wilde glasaal.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale palinglarven, die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet met maximaal matig ongerief voor maximaal 4134 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De DEC is van mening dat de haalbaarheid van het project groot is en dat het zeer zeker kennis zal opleveren. Echter, het is geen totaaloplossing.

Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
De DEC heeft de aanvrager vragen stelt over het aantal dieren,
antibioticagebruik, diersoort en afvalwater (milieufactoren)

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.
Het uitgebrachte advies is gebaseerd op meerderheid van stemmen.



Citaat D3: [...]Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het
preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor
specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.[...]

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat: Onderstaande kanttekeningen zijn naar voren gekomen tijdens
het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

- De DEC vraagt zich af of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot?
- De onderzoeker heeft aangegeven dat men voor de commerciële houderij niet wil werken met veel hormoon- en antibioticagebruik zoals in het project gedaan wordt, maar de DEC vraagt zich af welk risico men loopt dat de praktijk toch op het onderzoek gaat lijken. Zij kan hier geen inschatting voor doen.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Citaat: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.
 1	Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. Het minderheidsstandpunt van het ene DEC-lid is goed te volgen en helder weergegeven. Onder C11 schrijft u dat u het ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd vindt. De aanvrager geeft in bijlage 1 van de dierproeven dat alleen voor 36% van de vrouwen het cumulatief ongerief matig is. Het cumulatief ongerief voor de mannen, de overige 64% van de vrouwen en de larven uit bijlage 2 van de dierproeven heeft de aanvrager als licht ingeschat. Graag hadden we de onderbouwing van het licht cumulatief ongerief terug gezien bij C11.  3

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:51:50

5.2 lid1

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:49:45

misschien CCD even vragen om een reactie te formuleren aangaande het antibiotica gebruik en effect op milieu

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:50:17

je kunt nog even op het hergebruik punte ingaan

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: Dit project heeft het specifieke doel om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, larven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. Het halen van dit doel is een fundamenteel biologische uitdaging die een integrale aanpak van expertises vereist om het oplossen van deze specifieke bottleneck in het sluiten van de productiecyclus mogelijk te maken.</p> <p>[...]</p> <p>Subdoelen</p> <p>Het beschreven doel wordt bereikt door zowel eikwaliteit als larvenvitaliteit te verbeteren.</p> <p>De eikwaliteit zal worden verbeterd:</p> <ul style="list-style-type: none">- door verfijning in conditionering van de ouderdieren;- door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën;- door het op grote schaal kunnen fenotyperen van de eikwaliteit. <p>De larven vitaliteit zal worden verbeterd :</p> <ul style="list-style-type: none">- door aanpassingen in hatchery en nursery;- door het achterhalen van de fysiologische mechanismen die van belang zijn voor larvale ontwikkeling en overleving;- door het kunnen fenotyperen van de larvale kwaliteit. <p>Succesvolle larvale voedingsproeven zullen vervolgens aantonen dat bovenstaande subdoelen zijn bereikt. Het verbeteren van eikwaliteit en larvenkwaliteit zou zich moeten vertalen naar grote aantallen etende larven van goede kwaliteit. Daarmee zijn succesvolle voedingsproeven een validatie van de geboekte progressie.</p>
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Technologisch</p> <p>De ontwikkeling van de beogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecyclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproducieren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk en worden nieuwe aquacultuur sectoren leven ingeblazen. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan</p>

	<p>instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.</p> <p>Economisch Succesvolle kunstmatige reproductie (en dus productie van glasaal) levert direct voordeel aan 5.1 lid1c kweekbedrijven 5.1 lid1c 5.1 lid1c doordat zij dan kunnen bijdragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege de schaarste hoge prijzen kent. Dit neemt een belangrijke maatschappelijke zorg weg en stelt het bestaansrecht van de ondernemingen veilig. De partners verwachten dat de resultaten uit het onderzoek zullen bijdragen aan een positievere beeldvorming op het gebied van consumptie van paling in Nederland. Er is een enorme markt in Nederland voor betaalbare palingproducten. Voor elke 1000 ton productie van paling komen er 100-150 arbeidsplaatsen bij. Door de beschikbaarheid van geproduceerde glasaal kan de productie aan de vraag worden aangepast.</p> <p>Sociaal Het publiek is gebaat bij behoud van de paling als gewilde consumptievis, de rijke cultuur en tradities die dat met zich meebrengt en de banen die gegenereerd zullen worden. Maar het publiek is ook gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid.</p> <p>Ecologisch Een gesloten productiecycclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluizen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is voldoende onderbouwd.

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat C7 DEC advies: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Deze onderzoeksgroep heeft al ruime ervaring met dit onderzoeksgebied. Het Secretariaat heeft geen reden om te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.
---	--

3V's

Vervanging	
	3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen.
	3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: Simulatie niet mogelijk, alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.
Verminderen	
	3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.
	3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zal de seksuele maturatie en reproductie als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol. Door toepassing van de langzaam uitlekkende hormoonpreparaten hebben we het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes (en daarmee ook het wekelijkse verdoven en hanteren) weten te reduceren van gemiddeld 14 naar 8. Voor de mannetjes geldt een bestaand protocol van wekelijkse injecties (tenminste 10) die we hebben kunnen vervangen door 2 injecties. Indien we meer kennis verzamelen over het natuurlijk stimuleren van de maturatie zullen injecties verder, of zelfs geheel, kunnen worden ingeperkt.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Ook hier zal elke vorm van stress nadelig zijn voor het experimentele resultaat. Er wordt geen ongerief verwacht.</p>
<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	
<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 27,0% Matig 73,0% Licht	
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Voor dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van palingen. Deze bedreigde dieren komen voor een deel uit het wild en voor een deel is afkomstig van een palingkwekerij. De DEC vindt de keuze van de diersoort voldoende onderbouwd. **5.2 lid1**

De aanvrager wil mannen gebruiken in een ratio 1:3 ten opzichte van vrouwen. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Het **5.2 lid1**

Alle dieren worden aan het einde van het experiment gedood. Voor dieren die gesampeld worden doden vereist. De overige dieren worden gedood omdat schieralen niet meer eten en uiteindelijk sterven aan hongerdood. Het **5.2 lid1**

De aanvrager geeft aan drie soorten antibiotica te testen. De DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica. De DEC zou liever zien dat antibiotica therapeutisch wordt ingezet. Verder zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting. Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag. Dit DEC-lid is van mening dat de onderzoekers te lichtzinnig denken over de verontreiniging van antibiotica in ¹



2

Pagina: 12

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:54:22
Zou ook veen benoemen dat ze dit als dilemma hebben aangepaakt.

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:59:22
5.2 lid1



1

het afvalwater. 5.2 lid1

5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Pagina: 13

Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 16:04:01
In adobe pro zou je de bijlagen nog kunnen splisten (voor extra bonuspunten) ;)

Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 12-5-2022 15:54:57
Ook dilemma van uitzetten benoemen, **5.2 lid1**



Advies aan CCD

B

Datum 13 mei 2022
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215973

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL)
Aanvraagnummer: AVD202215973
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek
Behoud van de soort

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>De volgende vraag is gesteld aan de DEC:</p> <ul style="list-style-type: none">- In uw geplaatste kanttekening geeft u aan dat u zich afvraagt of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot? Het is echter niet duidelijk wat de inhoud van de discussie was. Kunt u inzicht geven die hoort bij deze kanttekening? <p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none">- In uw projectvoorstel geeft u onder 2.1 drie doelcategorieën weer (fundamenteel, translationeel en behoud van diersoort). In de NTS geeft u maar twee doelcategorieën aan (fundamenteel en translationeel). Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen?- U heeft in bijlage 1 van de dierproeven het cumulatieve ongerief per geslacht weergegeven. Kunt u in deze bijlage aangeven wat het cumulatieve ongerief van het totaal aantal dieren is?- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u aan dat de dieren gehouden worden volgens de bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. In deze richtlijn staat dat de huisvesting van de dieren moet zijn afgestemd op de fysiologische en ethologische behoeften van de daarin gehouden soorten. Met de voedingsproeven gaat u onderzoeken aan welke behoefte moet worden voldaan zodat de larven in leven blijven, en zich bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Kunt u aanpassen dat de dieren niet worden gehouden volgens de richtlijn?- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u onder K aan dat de overige
---------------	---

<p>larven verder worden opgegroeid. Dat er dieren de proef zouden overleven is niet terug te lezen in de NTS. Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen?</p> <p>De volgende vragen zijn gesteld over de NTS:</p> <p>- In de NTS noemt u 5.1 lid2h . De NTS dient anoniem te zijn. Kunt u de naam van de instelling uit de NTS verwijderen?</p> <p>- In de NTS gebruikt u woorden die voor een algemeen publiek lastig te volgen zijn. Kunt u de woorden vereenvoudigen zodat de NTS ook voor leken te lezen is?</p> <p>- In de NTS onder het tabblad 'expected harms' heeft u drie keer de categorie other fish gebruikt. Voor het publiceren op de Europese website mag elke categorie op dit tabblad maar een keer zijn ingevuld. Kunt u deze aantallen bij elkaar optellen en een keer weergeven onder deze categorie?</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven				
	Andere vissen (andere Pisces)	Europese aal	2.134	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn Dieren in/uit het wild Bedreigde dieren
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven				
	Andere vissen (andere Pisces)	Europese aal (larvaal)	2.000	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Bedreigde dieren

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

In bijlage 1 van de dierproeven gebruikt men dieren uit een palingkwekerij en dieren uit het wild.

Locatie uitvoering experimenten	<ul style="list-style-type: none"> - Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat A9 vraag DEC: De DEC vraagt zich af wat er met het afvalwater uit het project gebeurt. Dit is verontreinigd met o.a. antibiotica en hormonen.</p> <p>Citaat A9 antwoord aanvrager: Wij verwachten geen verontreiniging van afvalwater met hormonen. Gonadotropines hebben een zeer korte halfwaardetijd (minuten) en spelen dan geen rol. De halfwaardetijd van steroïden is langer (uren-dagen) maar de verontreiniging is niet significant. Collega's van de Leiden Universiteit hebben estradiol gemeten in het afvalwater van estradiol gevoerde paling maar die niveaus waren lager als in het tapwater. Overigens scheiden de maturerende vissen zelf ook op natuurlijke wijze hormonen af dus een onderscheid is niet of nauwelijks te maken. Antibiotica wordt gebruikt in zeer lage hoeveelheden aangezien de watervolumes waarin de eieren en larven worden gehouden laag zijn. Vervolgens wordt door verdunning van het afvalwater de verontreiniging zeer beperkt. Aangezien er ja of nee moet worden beantwoord is er met 'nee' beantwoord onder 'adverse environmental effects') hetgeen geen ruimte biedt om verdere uitleg toe te voegen.</p> <p>Citaat C6: Voor zover de DEC dat kan inschatten en zoals uit de antwoorden van de onderzoeker blijkt is de DEC niet unaniem van mening dat er geen aanleiding is om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. Met name één van de DEC-leden houdt zorg over de verontreiniging van het afvalwater en is van mening dat de onderzoekers hier te lichtzinnig over denken. Ook al wordt de antibiotica in het afvalwater zeer verdund en is het risico van verontreiniging zeer beperkt, het risico is er wel! Ook de korte halfwaardetijd van de hormonen is wat dit DEC-lid betreft onvoldoende reden om de effecten op het milieu niet in twijfel te trekken. Ook na een korte halfwaardetijd blijft de andere helft nog onveranderd aanwezig en hoe jet dan is afgebroken kan op zichzelf ook schadelijk zijn. (Bekend is dat het eten van vlees van dieren die met hormonen zijn behandeld ook na de wachttijd toch schadelijk is). Dit DEC-lid geeft aan dat het als voorwaarde voor vergunning graag ziet dat het afvalwater in voldoende mate gezuiverd wordt voordat het in het afvalwatersysteem geloosd wordt.</p> <p>Citaat C8: De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en</p>
-------------------	---

helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Echter, de DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica. Hoewel de onderzoekers aangeven dat het niet de bedoeling is dat dit voor de praktijk ontwikkeld zal worden is het blijkbaar op dit moment wel noodzakelijk om preventief antibiotica in te zetten om de larven in leven te houden. De verleiding is dan ook groot om bij succes in productie van glasaal, dit in stand te houden, mochten er geen alternatieven te bewerkstelligen zijn. Ook het gegeven, dat de onderzoeker een aantal verschillende antibiotica wil testen stemt de DEC niet hoopvol. Als je uiteindelijk toe wil naar een antibioticavrije productie van glasaal, lijkt de DEC de start hiernaar essentieel. Echter, het betreft hier ook wetenschappelijk onderzoek (in een kleine setting) in het hele traject van reproductie-ei-larve-glasaal. Op die gronden is de insteek van de onderzoeker te billijken, ondanks het gebruik van antibiotica, wat tot nu toe het enige is, dat succesvol blijkt in de overleving van glasaal, om ook tevens onderzoek te doen naar de ontwikkeling van ei tot glasaal. De DEC zou liever zien dat de onderzoeker op basis van Good Veterinary Practice antibiotica therapeutisch inzet en dus eerst diagnostiek bedrijft en aan de hand daarvan een keuze maakt voor meest effectieve antibiotica. Verder zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting.

Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4), paling staat op de Europese rode lijst
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Op dit moment is palingweek van Europese aal in gevangenschap nog niet mogelijk dus moeten glasaaltjes uit het wild gebruikt worden. De dieren uit bijlage 1 worden gebruikt in bijlage 2, maar de DEC vraagt zich af of dit als hergebruikt geclassificeerd moet worden.

Citaat C14: De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er zijn geen alternatieven om deze proeven zonder dieren uit te voeren. Er is wel een maatschappelijk alternatief: paling wordt gezien als een luxeproduct (vergelijk bont/nertsenhouderij) en niet een noodzakelijke voedselbron. Stoppen met eten van paling zou dit soort onderzoek overbodig maken.

Citaat C18: De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is: voor het bereiken van de doelstellingen van het onderzoek zijn meer vrouwelijke dan mannelijke dieren nodig.

Citaat C20: Op een vraag van de DEC over hergebruik van de dieren heeft de onderzoeker geantwoord dat de dieren, analoog aan de vrije natuur na verloop van tijd stoppen met eten waardoor ze sterven aan hongerdood. Om dit te voorkomen worden de dieren na de experimenten gedood.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt onderzoek naar reproductietechnologieën om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, het maximaal matige ongerief van 1957 juveniele alen en 2000 exogene voedende larven?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan een meer duurzame palingteelt in Nederland. Bij de ethische afweging is de DEC van mening dat het directe doel en het uiteindelijke doel ver uit elkaar liggen en dat het project ook bij kan dragen aan soortbehoud (ook een uiteindelijk ver weg liggend doel).

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren hebben een negatief welzijnsbelang van reëel morele waarde als gevolg van de handelingen in de experimenten. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
- De palingen in het wild hebben een ecologisch voordeel van reëel morele waarde wanneer er minder glasaal gevangen hoeft te worden t.b.v. de commerciële palingkweek. Ook het niet in gevangenschap hoeven leven ziet de DEC als een belang van reële morele waarde
- De palingen die gekweekt worden t.b.v. de commerciële palingkweek hebben geen voordeel.
- De branchorganisatie/viskwekers hebben een groot commercieel belang van beperkte morele waarde wanneer zij gebruik kunnen maken van gekweekte glasaal en niet afhankelijk zijn van wildvang.
- De onderzoekers, ^{5.1 lid2h} hebben een reëel wetenschappelijk belang van reële morele waarde.

- Daarnaast heeft de ^{5.1 lid2f} een reëel economisch belang omdat het contract research onderzoek betreft. De DEC waardeert dit als een belang van geringe morele waarde.
- Het ecosysteem heeft in de ogen van de DEC een belang van beperkte morele waarde bij minder vangst van wilde glasaal.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale palinglarven, die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet met maximaal matig ongerief voor maximaal 4134 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De DEC is van mening dat de haalbaarheid van het project groot is en dat het zeer zeker kennis zal opleveren. Echter, het is geen totaaloplossing. Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen stelt over het aantal dieren, antibioticagebruik, diersoort en afvalwater (milieufactoren)

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op meerderheid van stemmen.

Citaat D3: [...]Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.[...]

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat: Onderstaande kanttekeningen zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

- De DEC vraagt zich af of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en

	<p>relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot?</p> <ul style="list-style-type: none"> • De onderzoeker heeft aangegeven dat men voor de commerciële houderij niet wil werken met veel hormoon- en antibioticagebruik zoals in het project gedaan wordt, maar de DEC vraagt zich af welk risico men loopt dat de praktijk toch op het onderzoek gaat lijken. Zij kan hier geen inschatting voor doen.
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid.</p> <p>Citaat: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.</p>
	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Het minderheidsstandpunt van het ene DEC-lid is goed te volgen en helder weergegeven.</p> <p>Onder C9 vraagt u zich af of het gebruik van de dieren uit bijlage 1 als hergebruik moet worden geclassificeerd voor het gebruik in bijlage 2. Dit hoeft niet als hergebruik worden geclassificeerd omdat de dieren in bijlage 1 geen handelingen ondergaan.</p> <p>Onder C11 schrijft u dat u het ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd vindt. De aanvrager geeft in bijlage 1 van de dierproeven dat alleen voor 36% van de vrouwen het cumulatief ongerief matig is. Het cumulatief ongerief voor de mannen, de overige 64% van de vrouwen en de larven uit bijlage 2 van de dierproeven heeft de aanvrager als licht ingeschat. Graag hadden we de onderbouwing van het licht cumulatief ongerief terug gezien bij C11.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: Dit project heeft het specifieke doel om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, larven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. Het halen van dit doel is een fundamenteel biologische uitdaging die een integrale aanpak van expertises vereist om het oplossen van deze specifieke bottleneck in het sluiten van de productiecycclus mogelijk te maken. [...] Subdoelen Het beschreven doel wordt bereikt door zowel eikwaliteit als larvenvitaliteit te verbeteren. De eikwaliteit zal worden verbeterd: - door verfijning in conditionering van de ouderdieren; - door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën; - door het op grote schaal kunnen fenotyperen van de eikwaliteit. De larven vitaliteit zal worden verbeterd : - door aanpassingen in hatchery en nursery; - door het achterhalen van de fysiologische mechanismen die van belang zijn voor larvale ontwikkeling en overleving; - door het kunnen fenotyperen van de larvale kwaliteit. Succesvolle larvale voedingsproeven zullen vervolgens aantonen dat bovenstaande subdoelen zijn bereikt. Het verbeteren van eikwaliteit en larvenkwaliteit zou zich moeten vertalen naar grote aantallen etende larven van goede kwaliteit. Daarmee zijn succesvolle voedingsproeven een validatie van de geboekte progressie.</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Technologisch De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk en worden nieuwe aquacultuur sectoren leven ingeblazen. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan</p>

	<p>instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.</p> <p>Economisch Succesvolle kunstmatige reproductie (en dus productie van glasaal) levert direct voordeel aan 5.1 lid1c kweekbedrijven 5.1 lid2h doordat zij dan kunnen bijdragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege de schaarste hoge prijzen kent. Dit neemt een belangrijke maatschappelijke zorg weg en stelt het bestaansrecht van de ondernemingen veilig. De partners verwachten dat de resultaten uit het onderzoek zullen bijdragen aan een positievere beeldvorming op het gebied van consumptie van paling in Nederland. Er is een enorme markt in Nederland voor betaalbare palingproducten. Voor elke 1000 ton productie van paling komen er 100-150 arbeidsplaatsen bij. Door de beschikbaarheid van geproduceerde glasaal kan de productie aan de vraag worden aangepast.</p> <p>Sociaal Het publiek is gebaat bij behoud van de paling als gewilde consumptievis, de rijke cultuur en tradities die dat met zich meebrengt en de banen die gegenereerd zullen worden. Maar het publiek is ook gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid.</p> <p>Ecologisch Een gesloten productiecycclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluizen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is voldoende onderbouwd.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 DEC advies: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Deze onderzoeksgroep heeft al ruime ervaring met dit onderzoeksgebied.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden om te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: Simulatie niet mogelijk, alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zal de seksuele maturatie en reproductie als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol. Door toepassing van de langzaam uitlekkende hormoonpreparaten hebben we het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes (en daarmee ook het wekelijkse verdoven en hanteren) weten te reduceren van gemiddeld 14 naar 8. Voor de mannetjes geldt een bestaand protocol van wekelijkse injecties (tenminste 10) die we hebben kunnen vervangen door 2 injecties. Indien we meer kennis verzamelen over het natuurlijk stimuleren van de maturatie zullen injecties verder, of zelfs geheel, kunnen worden ingeperkt.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Ook hier zal elke vorm van stress nadelig zijn voor het experimentele resultaat. Er wordt geen ongerief verwacht.</p>
<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	
<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 27,0% Matig 73,0% Licht	
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Voor dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van palingen. Deze diersoort staat op de rode lijst. De dieren zullen deels uit het wild komen en deels van een palingkwekerij. De DEC vindt de keuze van de diersoort voldoende onderbouwd. 5.2 lid1

De aanvrager wil mannen gebruiken in een ratio 1:3 ten opzichte van vrouwen. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Het 5.2 lid1

Alle dieren worden aan het einde van het experiment gedood. Voor dieren die gesampeld worden is doden vereist. De overige dieren in bijlage 1 van de dierproeven worden gedood. De dieren zullen na verloop van tijd stoppen met eten waardoor ze uiteindelijk sterven aan hongerdood. 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan drie soorten antibiotica te testen. De DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica en kaart dit aan als dilemma. De DEC zou liever zien dat antibiotica therapeutisch wordt ingezet. Verder zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting. Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag. Dit DEC-lid

is van mening dat de onderzoekers te lichtzinnig denken over de verontreiniging van antibiotica in het afvalwater. 5.2 lid1

5.2 lid1

e DEC vraagt zich af of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is en of dit kan worden gezien als een invasieve exoot. Het is echter niet duidelijk wat de inhoud van de discussie was. De uitkomst hangt mogelijk samen met de doelstelling 'behoud van de soort'. 5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 13 mei 2022 15:57
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: RE: DEC advies AVD 5.1 lid2h 202215973

Geachte 5.1 lid2e ,

In uw DEC-advies heeft u een kanttkening geplaatste waarbij u zich afvraagt of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot? Het is echter niet duidelijk wat de inhoud van de discussie was. Kunt u inzicht geven die hoort bij deze kanttkening?

Het dossier wordt 20 mei in de CCD-vergadering besproken. Wij zouden het behulpzaam vinden als u voor die tijd een reactie kunt geven.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e
Namens:
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800-7890789 E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: dinsdag 3 mei 2022 15:40
Aan: 'Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)' <info@zbo-ccd.nl>
Onderwerp: DEC advies AVD 5.1 lid2h 202215973

Geachte CCD,

Hierbij stuur ik het DEC-advies en de aangepaste documenten van aanvraag AVD 5.1 lid2h 202215973

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2h

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-14:30

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de **5.1 lid2h** is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: donderdag 19 mei 2022 16:00
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: DEC advies AVD 5.1 lid2f 202215973

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Beste 5.1 lid2e

Excuses voor de late reactie, de mail was aan mijn aandacht ontsnapt. De DEC heeft gediscussieerd of de dieren na afloop van het experiment in de vrije natuur zouden kunnen worden uitgezet of dat dit onwenselijk is omdat het als een invasieve exoot (en dus ongewenst) kan worden gezien. De uitkomst van de discussie is dat de DEC geen antwoord heeft op deze vraag. Is dit voldoende toegelicht?

Vr.gr. 5.1 lid2e

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: vrijdag 13 mei 2022 15.57
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: RE: DEC advies AVD 5.1 lid2h 202215973

Geachte mevrouw 5.1 lid2e

In uw DEC-advies heeft u een kanttekening geplaatst waarbij u zich afvraagt of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot? Het is echter niet duidelijk wat de inhoud van de discussie was. Kunt u inzicht geven die hoort bij deze kanttekening?

Het dossier wordt 20 mei in de CCD-vergadering besproken. Wij zouden het behulpzaam vinden als u voor die tijd een reactie kunt geven.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Namens:
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800-7890789 E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: dinsdag 3 mei 2022 15:40
Aan: 'Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)' <info@zbo-ccd.nl>
Onderwerp: DEC advies AVD 5.1 lid2h 202215973

Geachte CCD,

Hierbij stuur ik het DEC-advies en de aangepaste documenten van aanvraag AVD 5.1 lid2h 202215973

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2e

bezoekadres: 5.1 lid2h

e-mail: 5.1 lid2h

5.1 lid2h

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-14:30

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de 5.1 lid2h is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: vrijdag 20 mei 2022 14:27
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e); 5.1 lid2e
Onderwerp: Input op dossier

Beste 5.1 lid2e

Op dit moment is er voor dossier AVD202215973 geen quorum. Het dossier is in de vergadering besproken. De twee aanwezige leden geven aan dat ze het project vergunbaar vinden.

De DEC geeft twee knelpunten aan. Een ervan is het uitzetten van de soort in het wild. Tijdens de vergadering is besloten dat terugplaatsing van de dieren in dit dossier niet aan de orde is.

Het tweede punt is het gebruik van antibiotica. In de vergadering is hierbij stil gestaan. Er is besloten niet mee te gaan met het standpunt van het ene DEC-lid.

Graag zou ik je input willen op dit dossier. Via [de link](#) kun je het dossier vinden, je wordt doorgelinkt naar je eigen bestuursmap.

Ik ben maandag niet aanwezig. Mocht je nog IT problemen hebben, dan mag je contact opnemen met 5.1 lid2e

Met hartelijke groet,

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 23 mei 2022 12:25
Aan: 5.1 lid2e)
CC: 5.1 lid2e); 5.1 lid2e 5.1 lid2e
 5.1 lid2e ; 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Input op dossier

Beste allen,

Met interesse heb ik het project doorgenomen.

Het betreft een fundamenteel onderzoeksproject waarin getracht wordt om glasaal op te kweken tot volwassen aal tbv de commerciële houderij. Men wil meer inzicht krijgen in de reproductiecyclus en productietechnologieën testen. Ik zie een aantal zorgpunten:

1. Het betreft een zeer intensieve aanpak met veel hormooninjecties tot 14 x gonadotropines en steroïden en daarnaast het gebruik van antibiotica in de eerste week van opkweek van de glasaal. Een methode die dus volstrekt onacceptabel zou zijn voor de commerciële aalhouderij. De onderzoeker geeft aan dat men uiteindelijk voor de commerciële houderij **minder** hormonen nodig denkt te hebben, dus niet niet nul.
2. Er zijn zorgen geuit over hormonen en antibiotica, die in het afvalwater terechtkomen. De onderzoeker heeft in zijn/haar antwoord gereageerd door te verwijzen naar de halfwaardetijd van de hormonen. Echter niet naar die van de antibiotica. Naar mijn mening heeft een DEC-lid daar terecht zorg over.
3. In de NTS en ook in het antwoord van de onderzoeker wordt gesuggereerd dat deze methode ook van nut kan zijn voor de wild populatie omdat men gekweekte alen zou kunnen terugzetten. Hier heeft een DEC lid naar mijn mening een sterk punt. Immers wie garandeert dat door de inzet van productietechnologieën niet de gekweekte aal wezenlijk gaat verschillen van de wilde aal. Daarmee zou dus juist een gevaar voor de wilde populatie kunnen ontstaan.

Voor mij kan dit project slechts vergunbaar zijn onder de volgende voorwaarden:

- a) Het is een fundamenteel onderzoeksproject.
- b) Mogelijke impact voor wild populatie, door terugzetten etc, wordt uit de NTS gehaald en elders uit de tekst.
- c) Ik verwacht van de onderzoeker dat de problematiek van verontreiniging van het afvalwater door hormonen en antibiotica echt aangepakt wordt. Dit kan door drempelwaarden voor die stoffen aan te geven voordat ze geloosd worden, die als zodanig geaccepteerd zijn. Dan wel door het reinigen van het afvalwater.

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e
Sent: Friday, May 20, 2022 2:27 PM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e 5.1 lid2e
Subject: Input op dossier

Beste 5.1 lid2e

Op dit moment is er voor dossier AVD202215973 geen quorum. Het dossier is in de vergadering besproken. De twee aanwezige leden geven aan dat ze het project vergunbaar vinden.

De DEC geeft twee knelpunten aan. Een ervan is het uitzetten van de soort in het wild. Tijdens de vergadering is besloten dat terugplaatsing van de dieren in dit dossier niet aan de orde is.

Het tweede punt is het gebruik van antibiotica. In de vergadering is hierbij stil gestaan. Er is besloten niet mee te gaan met het standpunt van het ene DEC-lid.

Graag zou ik je input willen op dit dossier. Via [de link](#) kun je het dossier vinden, je wordt doorgelinkt naar je eigen bestuursmap.

Ik ben maandag niet aanwezig. Mocht je nog IT problemen hebben, dan mag je contact opnemen met [5.1 lid2e](#) [5.1 lid2e](#)

Met hartelijke groet,

[5.1 lid2e](#)

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 23 mei 2022 18:13
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Input op dossier

Ha 5.1 lid2e

Ik ben benieuwd hoe je hiermee verder gaat. Voor mij is belangrijk dat we de input van 5.1 lid2e en het DEC-lid op de verontreiniging wel benoemen in een opmerking, maar niet in een voorwaarde. Volgens mij valt dit namelijk buiten de Wod. Wil je daar nog even goed naar kijken? We moeten dan in de opmerking dus aandacht hiervoor vragen en aangeven dat dit buiten deze vergunning valt.

Hartelijke groet, 5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 23 mei 2022 12:25
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e; 5.1 lid2e; 5.1 lid2e; 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Input op dossier

Beste allen,

Met interesse heb ik het project doorgenomen.

Het betreft een fundamenteel onderzoeksproject waarin getracht wordt om glasaal op te kweken tot volwassen aal tbv de commerciële houderij. Men wil meer inzicht krijgen in de reproductiecyclus en productietechnologieën testen. Ik zie een aantal zorgpunten:

1. Het betreft een zeer intensieve aanpak met veel hormooninjecties tot 14 x gonadotropines en steroïden en daarnaast het gebruik van antibiotica in de eerste week van opkweek van de glasaal. Een methode die dus volstrekt onacceptabel zou zijn voor de commerciële aalhouderij. De onderzoeker geeft aan dat men uiteindelijk voor de commerciële houderij **minder** hormonen nodig denkt te hebben, dus niet niet nul.
2. Er zijn zorgen geuit over hormonen en antibiotica, die in het afvalwater terechtkomen. De onderzoeker heeft in zijn/haar antwoord gereageerd door te verwijzen naar de halfwaarde tijd van de hormonen. Echter niet naar die van de antibiotica. Naar mijn mening heeft een DEC-lid daar terecht zorg over.
3. In de NTS en ook in het antwoord van de onderzoeker wordt gesuggereerd dat deze methode ook van nut kan zijn voor de wild populatie omdat men gekweekte alen zou kunnen terugzetten. Hier heeft een DEC lid naar mijn mening een sterk punt. Immers wie garandeert dat door de inzet van productietechnologieën niet de gekweekte aal wezenlijk gaat verschillen van de wilde aal. Daarmee zou dus juist een gevaar voor de wilde populatie kunnen ontstaan.

Voor mij kan dit project slechts vergunbaar zijn onder de volgende voorwaarden:

- a) Het is een fundamenteel onderzoeksproject.
- b) Mogelijke impact voor wild populatie, door terugzetten etc, wordt uit de NTS gehaald en elders uit de tekst.
- c) Ik verwacht van de onderzoeker dat de problematiek van verontreiniging van het afvalwater door hormonen en antibiotica echt aangepakt wordt. Dit kan door drempelwaarden voor die stoffen aan te geven voordat ze geloosd worden, die als zodanig geaccepteerd zijn. Dan wel door het reinigen van het afvalwater.

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e
Sent: Friday, May 20, 2022 2:27 PM
To: 5.1 lid2e

Cc: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2e

Subject: Input op dossier

Beste 5.1 lid2e

Op dit moment is er voor dossier AVD202215973 geen quorum. Het dossier is in de vergadering besproken. De twee aanwezige leden geven aan dat ze het project vergunbaar vinden.

De DEC geeft twee knelpunten aan. Een ervan is het uitzetten van de soort in het wild. Tijdens de vergadering is besloten dat terugplaatsing van de dieren in dit dossier niet aan de orde is.

Het tweede punt is het gebruik van antibiotica. In de vergadering is hierbij stil gestaan. Er is besloten niet mee te gaan met het standpunt van het ene DEC-lid.

Graag zou ik je input willen op dit dossier. Via [de link](#) kun je het dossier vinden, je wordt doorgelinkt naar je eigen bestuursmap.

Ik ben maandag niet aanwezig. Mocht je nog IT problemen hebben, dan mag je contact opnemen met 5.1 lid2e

Met hartelijke groet,

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 25 mei 2022 08:57
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2e 202215973

Geachte 5.1 lid2e,

Op 05-04-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215973. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- In de NTS noemt u het 5.1 lid2h . De NTS dient anoniem te zijn. Kunt u de naam van de instelling uit de NTS verwijderen?
- In de NTS gebruikt u woorden die voor een algemeen publiek lastig te volgen zijn. Kunt u de woorden vereenvoudigen zodat de NTS ook voor leken te lezen is?
- In de NTS onder het tabblad 'expected harms' heeft u drie keer de categorie other fish gebruikt. Voor het publiceren op de Europese website mag elke categorie op dit tabblad maar een keer zijn ingevuld. Kunt u deze aantallen bij elkaar optellen en een keer weergeven onder deze categorie?
- In NTS schrijft u "Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om uiteindelijke dood voorkomen". Kunt u deze zin in de NTS voor het publiek verduidelijken?

Onduidelijkheden

- U schrijft in het projectvoorstel bij het uiteindelijke doel dat u de mogelijkheid om kunstmatig geproduceerde glasaal te gebruiken voor uitzetting kan worden onderzocht. Dit sluit niet aan bij het onmiddellijk doel wat u momenteel onderzoekt. Kunt u de stukken over het uitzetten en de mogelijke impact erdoor op de wild populatie uit het projectvoorstel en de NTS halen?
- Het doel van dit project is gericht op het sluiten van de cyclus en het niet meer nodig hebben van wildvang voor de commerciële kweek, wat een fundamenteel doel is. In uw projectvoorstel geeft u onder 2.1 drie doelcategorieën weer (fundamenteel, translationeel en behoud van diersoort). In de NTS geeft u twee doelcategorieën aan (fundamenteel en translationeel). De doelcategorieën translationeel en behoud van diersoort sluiten niet aan bij het onderzoek wat in dit projectvoorstel is aangevraagd. Kunt u in beide documenten de doelcategorie aanpassen zodat deze aansluit bij het onmiddellijk doel van het onderzoek?
- U heeft in bijlage 1 van de dierproeven het cumulatieve ongerief per geslacht weergegeven. Kunt u in deze bijlage aangeven wat het cumulatieve ongerief van het totaal aantal dieren is?
- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u aan dat de dieren gehouden worden volgens de bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. In deze richtlijn staat dat de huisvesting van de dieren moet zijn afgestemd op de fysiologische en

ethologische behoeften van de daarin gehouden soorten. Met de voedingsproeven gaat u onderzoeken aan welke behoefte moet worden voldaan zodat de larven in leven blijven, en zich bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Kunt u aanpassen dat de dieren niet worden gehouden volgens de richtlijn?

- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u onder K aan dat de overige larven verder worden opgegroeid. Dat er dieren de proef zouden overleven is niet terug te lezen in de NTS. Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Niet technische samenvatting

- In de NTS noemt u **5.1 lid2h**. De NTS dient anoniem te zijn. Kunt u de naam van de instelling uit de NTS verwijderen?

Verwijderd.

- In de NTS gebruikt u woorden die voor een algemeen publiek lastig te volgen zijn. Kunt u de woorden vereenvoudigen zodat de NTS ook voor leken te lezen is?

Aangepast.

Migrante > migrerende.

De conditionering > het stimuleren.

Oocyt maturatie > eicelrijping.

Fysiologische verwijderd.

Met hypofyse extract verwijderd.

Biopsie > monster.

Extra injectie met hypofyse extract > extra hormooninjectie.

hCG verwijderd.

Richting cloaca verwijderd.

- In de NTS onder het tabblad 'expected harms' heeft u drie keer de categorie other fish gebruikt. Voor het publiceren op de Europese website mag elke categorie op dit tabblad maar een keer zijn ingevuld. Kunt u deze aantallen bij elkaar optellen en een keer weergeven onder deze categorie?

Aangepast.

- In NTS schrijft u "Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om uiteindelijke dood voorkomen". Kunt u deze zin in de NTS voor het publiek verduidelijken?

Aangepast: "Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om hongeringseffecten en uiteindelijke uithongering voorkomen"

Onduidelijkheden

- U schrijft in het projectvoorstel bij het uiteindelijke doel dat u de mogelijkheid om kunstmatig geproduceerde glasaal te gebruiken voor uitzetting kan worden onderzocht. Dit sluit niet aan bij het onmiddellijk doel wat u momenteel onderzoekt. Kunt u de stukken over het uitzetten en de mogelijke impact erdoor op de wild populatie uit het projectvoorstel en de NTS halen?

Verwijderd.

- Het doel van dit project is gericht op het sluiten van de cyclus en het niet meer nodig hebben van wildvang voor de commerciële kweek, wat een fundamenteel doel is. In uw projectvoorstel geeft u onder 2.1 drie doelcategorieën weer (fundamenteel, translationeel en behoud van diersoort). In de NTS geeft u twee doelcategorieën aan (fundamenteel en translationeel). De doelcategorieën translationeel en behoud van diersoort sluiten niet aan bij het onderzoek wat in dit projectvoorstel is aangevraagd. Kunt u in beide documenten de doelcategorie aanpassen zodat deze aansluit bij het onmiddellijke doel van het onderzoek?

Aangepast.

- U heeft in bijlage 1 van de dierproeven het cumulatieve ongerief per geslacht weergegeven. Kunt u in deze bijlage aangeven wat het cumulatieve ongerief van het totaal aantal dieren is?

Toegevoegd.

- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u aan dat de dieren gehouden worden volgens de bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. In deze richtlijn staat dat de huisvesting van de dieren moet zijn afgestemd op de fysiologische en ethologische behoeften van de daarin gehouden soorten. Met de voedingsproeven gaat u onderzoeken aan welke behoefte moet worden voldaan zodat de larven in leven blijven, en zich bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Kunt u aanpassen dat de dieren niet worden gehouden volgens de richtlijn?

Aangepast. Toegevoegde tekst: "Met de voedingsproeven wordt onderzocht aan welke behoefte moet worden voldaan zodat de larven in leven blijven, hetgeen zich bewijst in het exogeen voeden van de larven."

- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u onder K aan dat de overige larven verder worden opgegroeid. Dat er dieren de proef zouden overleven is niet terug te lezen in de NTS. Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen?

Toegevoegd aan NTS (in de tekst, niet in de tabel 'fate of animals kept alive' omdat de larven die in leven blijven nooit proefdieren zijn geworden).



Centrale Commissie Dierproeven

Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL) |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production |
| | | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare |
| | | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
| | | <input type="checkbox"/> Higher education or training |
| | | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries |
| | | <input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures |

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

Aanleiding

Aanleiding voor deze aanvraag is de sterke achteruitgang van de Europese aal (of paling), wat de kwekers er toe heeft aangezet een duurzaam alternatief te willen ontwikkelen voor de onttrekking van glasaal (pootgoed) uit de natuurlijke populatie voor opkweek. Het sluiten van de productiecycclus van de paling kan zowel een duurzame aquacultuur realiseren als bijdragen aan een duurzaam natuurlijk bestand door het verlagen van de visserijdruk. Het onderzoek naar vermeerdering van de aal onder geconditioneerde omstandigheden is in 2015 uitgezet door [5.1 lid2h](#)

[5.1 lid2h](#) produceert inmiddels drie keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dit project heeft het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Migrante soorten die net als de paling van belang zijn voor consumptie, maar waarbij het scheppen van kweekmogelijkheden ook van belang is voor instandhouding van de natuurlijke populaties.

Wat is er al bekend?

De Europese aal migreert éénmalig 6.000 km naar de Sargassozee om te paaien en vervolgens te sterven. Dit leiden we af uit twee feiten: in het najaar trekken puberende alen richting zee, en in het voorjaar zijn twee dagen oude larven aangetroffen in de Sargassozee (Schmidt, 1912, 1923). Op het moment dat ze in de zee verdwijnen zijn ze nog in een prepuberale staat en hebben de vrouwtjes een relatieve gonadenmassa (GSI) van max. 2%. Zo'n 6 maanden later in het voorjaar als ze volledig zijn afgerijpt in de Sargasso zee kan die GSI zijn opgelopen tot zo'n 60% (Palstra et al., 2005). Migrerende alen eten niet meer en vertrouwen dus volledig op hun energievoorraden voor succesvolle migratie en maturatie (afrijping). Na de paai zijn meer dan 70% van de energievoorraden uitgeput waarmee wordt aangenomen dat de alen sterven.

Er is echter nog nooit een afgerijpte paling gevonden in de Sargassozee, alle bestaande kennis van seksuele maturatie en reproductie komt uit het lab. Onderzoeksinspanningen hebben geregeld geleid tot larvenproductie maar het vóórkomen van larvale abnormaliteiten en sterften zijn hoog. Dit geldt ook nog altijd voor de Japanse aal waarvoor reeds een vijfde generatie is verkregen (Tsukamoto, 2019). Wel hebben de resultaten van de Japanse onderzoekers laten zien dat glasaal kan worden verkregen en de cyclus kan worden gesloten. Voor de Europese aal zullen dan eerst reproductietechnologieën moeten worden ontwikkeld voor de productie van vitale palinglarven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. De Japanse aal hoeft minder ver te zwemmen naar de paaigronden in de Marianentrog en is daarom minder moeilijk te reproduceren. Maar aangezien ze minder ver hoeven te zwemmen zijn ze ook minder vet en daarom niet geschikt voor de rokerij. Het onderzoek richt zich daarom op de Europese paling. Bovendien kampt men zelfs in de vijfde generatie van Japanse aal nog altijd met dezelfde problematische issues die we in ons onderzoek direct trachten op te lossen.

Gedurende de eerst vijf jaren [5.1 lid2h](#) hebben we een manier ontwikkeld om van pootaaltjes in 1,5 jaar goede ouderdieren te maken via feminisering, de juiste voeding en gesimuleerde migratie (Mes

et al., 2016): Een aanzienlijke generatieduur verkorting ten opzichte van wilde aal die tenminste 7 tot wel meer dan 50 jaar oud zijn. Deze gefeminiseerde alen, maar ook wilde schieralen, zijn succesvol tot afrijping gebracht via het gangbare protocol, en na innovaties in dat protocol zoals het gebruik van steroïd-implantaten en aal-specifieke recombinante gonadotropinen. Methodiek is ontwikkeld om in vitro oocyt maturatie te volgen en ovulatie-inducerende hormonen en doses te testen, als ook om eikwaliteit te kunnen beoordelen. Spontane afrijping is voor het eerst geobserveerd en wordt gemonitord (Palstra et al., 2020). Inmiddels worden drie keer per week larvenbatches geproduceerd die tot 25 dagen in leven blijven (Jéhannet et al., 2021). Parallel aan het toegenomen succes in larvenproductie wordt gewerkt aan het design van een hatchery-nursery om de juiste larvale condities te kunnen testen.

Door de ontwikkelde protocollen en de constante verbetering van die protocollen zijn we in staat om gecontroleerd larven te produceren met wilde glasaal als uitgangsmateriaal. Zo produceren we inmiddels twee keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dat kan worden geconcludeerd uit eibatches waarvan een groot deel zinkt of die niet leiden tot embryonale ontwikkeling; vertraging in het uitkomen van de eieren; sensitiviteit voor pathogenen; een diversiteit aan abnormale ontwikkelingen, en hoge mortaliteit, met name in de eerste week als larven van passief verticaal hangend in de waterkolom over moeten schakelen naar actief zwemmen en bijzonder gevoelig zijn voor beschadiging. Door deze lage vitaliteit krijgen we de larven nog niet tot exogene voeding en daarmee kunnen we nog niet de glasaal produceren waarmee we de productiecycclus kunnen sluiten. Om dat te bereiken heeft dit project het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven.

Referenties

- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Heinsbroek, L.T.N., Kruijt, L., Dirks, R.P., Swinkels, W., Komen, H. (2021) What goes wrong during early development of artificially reproduced European eel *Anguilla anguilla*? Clues from the larval transcriptome and gene expression patterns. *Animals* 11, 1710.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367–372.
- Palstra AP, Cohen EGH, Niemantsverdriet PRW, Van Ginneken VJT, Van den Thillart GEEJM (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1–4): 533–547.
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S. (2020) First observation of a spontaneously matured female European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific Reports* 10: 2339
- Schmidt, J. (1912) The reproduction and spawning places of the fresh-water eel (*Anguilla vulgaris*). *Nature* 89: 633-636.
- Schmidt, J. (1923) Breeding places and migration of the eel. *Nature* 111: 51-54.
- Tsukamoto K. (2019) Update Nihon University progression. 4th EELRIC workshop, Berlin, October 2019.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives
-

Onmiddellijk doel

Dit project heeft het specifieke doel om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, larven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. Het halen van dit doel is een fundamenteel biologische uitdaging die een integrale aanpak van expertises vereist om het oplossen van deze specifieke bottleneck in het sluiten van de productiecycclus mogelijk te maken.

Uiteindelijk doel

Het uiteindelijk doel is om een succesvolle kunstmatige reproductie van paling te bewerkstelligen dat zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in Nederlandse aquacultuurbedrijven. Het sluiten van de productiecyclus kan de aquacultuur voorzien van pootgoed en loskoppelen van de visserij op glasaal, om zodoende zowel een duurzaam natuurlijk bestand als duurzame aquacultuur te realiseren. De inspanningen van Japanse onderzoekers die de productiecyclus van de Japanse aal hebben gesloten en inmiddels een vijfde generatie hebben voortgebracht, kunnen de progressie voor de Europese aal accelereren.

Het beschreven onderzoek met als doel de productiecyclus van de paling te sluiten is een fundamenteel wetenschappelijke uitdaging. Het gebruik van hormonen om paling tot reproductie te brengen en antibiotica om larven te laten overleven stelt in staat deze processen te bestuderen. Vervolgens kan dan voor een toekomstige productie omgeving worden onderzocht hoe de hormonale interventies kunnen worden vervangen door gebruik te maken van natuurlijke triggers en hoe antibiotica weer kan worden vervangen door gebruik te maken van de microbiële samenstelling van gerijpt zeewater. Bovendien zal dat worden vergemakkelijkt door verdergaande domesticatie. En uiteindelijk zal het ouderdier dat tot reproductie wordt aangezet niet worden geconsumeerd, alleen de nakomelingen.

Wat gaat dit project opleveren?

Vitale larven kunnen tot voeden worden aangezet en opgroeien tot glasaal. Met het herhalen van het ontwikkelde protocol om van glasaal goede ouderdieren te maken zal de cyclus kunnen worden gesloten. Dat kan vervolgens concreet leiden tot bedrijfsmatige productie van glasaal in de Nederlandse aquacultuurbedrijven waarmee niet alleen een duurzaam voortbestaan van de sector wordt geborgd maar waarmee ook groei van de sector mogelijk wordt gemaakt. De glasaalvisserij, en algehele bevissing van de wilde populatie, wordt daarmee overbodig zodat de druk op de natuurlijke populatie wordt verminderd.

Succesvolle kunstmatige reproductie is een wereldwijde primeur. Het onderzoek sluit aan op een rijke historie en aanzienlijke track record binnen het palingreproductie onderzoek. De nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën en de gegenereerde kennis komt het visreproductie onderzoek naar andere, voor de aquacultuur belangrijke, maar lastig te reproduceren, iconische soorten als steur en tonijn, ten goede. Aangezien de problematiek voor het reproduceren van vissen in gevangenschap generiek is en vaak alleen verschilt in de levensfase waarin de onderdrukking van de reproductie plaats heeft (voor paling al voor aanvang van de puberteit) wordt verwacht dat de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën breder inzetbaar zijn dan voor paling alleen.

Subdoelen

Het beschreven doel wordt bereikt door zowel eikwaliteit als larvenvitaliteit te verbeteren.

De eikwaliteit zal worden verbeterd:

- door verfijning in conditionering van de ouderdieren;
- door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën;
- door het op grote schaal kunnen fenotyperen van de eikwaliteit.

De larven vitaliteit zal worden verbeterd :

- door aanpassingen in hatchery en nursery;
- door het achterhalen van de fysiologische mechanismen die van belang zijn voor larvale ontwikkeling en overleving;
- door het kunnen fenotyperen van de larvale kwaliteit.

Succesvolle larvale voedingsproeven zullen vervolgens aantonen dat bovenstaande subdoelen zijn bereikt. Het verbeteren van eikwaliteit en larvenkwaliteit zou zich moeten vertalen naar grote aantallen etende larven van goede kwaliteit. Daarmee zijn succesvolle voedingsproeven een validatie van de geboekte progressie.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We zijn nu in staat om met een serie houderij technieken (feminisatie, broodstock voeding, gesimuleerde migratie) van wilde glasaal goede vrouwelijke ouderdieren te maken in slechts 1.5 jaar, tenminste een 5x generatieduurverkorting. Zowel deze ouderdieren als wilde ouderdieren kunnen we nu sneller tot afrijping brengen en we hebben methodiek ontwikkeld om tot betere resultaten te komen. Inmiddels betaalt zich dat uit en kunnen we drie keer per week larvenbatches produceren, tot wel 100.000 larven per batch die tot 25 dagen in leven blijven. Ook de overleving hebben we weten te verbeteren door gebruik van antibiotica. Het traject van glasaal tot larve hebben we dus rond. Larvenkwaliteit voldoet echter nog niet om de laatste stap naar glasaalproductie te kunnen zetten en is de uitdaging voor nieuw onderzoek. Met de afgelopen 5 jaar aan opgebouwde kennis hebben we de juiste doelen voor dit project weten te stellen om de larvenvitaliteit te verbeteren en succesvol voedingsproeven te kunnen doen.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project? No Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

Aal is in 2007 in Appendix II in de CITES-lijst geplaatst. CITES is een internationaal verdrag tussen landen die de handel in diersoorten en planten beperkt. Appendix II houdt in dat de soort "niet noodzakelijkerwijs wordt bedreigd, maar dat het verstandig wordt geacht de handel te reguleren opdat die handel geen bedreiging vormt voor de soort en van daaruit maatregelen worden genomen die de handel in aal beperkt". Hierdoor mag er bijvoorbeeld geen export van Europese aal uit de EU zijn.

3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Technologisch

De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk en worden nieuwe aquacultuur sectoren leven ingeblazen. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.

Economisch

Succesvolle kunstmatige reproductie (en dus productie van glasaal) levert direct voordeel aan de **5.1 lid1c** kweekbedrijven **5.1 lid1c** doordat zij dan kunnen bijdragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege de schaarste hoge prijzen kent. Dit neemt een belangrijke maatschappelijke zorg weg en stelt het bestaansrecht van de ondernemingen veilig. De partners verwachten dat de resultaten uit het onderzoek zullen

bijdragen aan een positievere beeldvorming op het gebied van consumptie van paling in Nederland. Er is een enorme markt in Nederland voor betaalbare palingproducten. Voor elke 1000 ton productie van paling komen er 100-150 arbeidsplaatsen bij. Door de beschikbaarheid van geproduceerde glasaal kan de productie aan de vraag worden aangepast.

Sociaal

Het publiek is gebaat bij behoud van de paling als gewilde consumptievis, de rijke cultuur en tradities die dat met zich meebrengt en de banen die gegenereerd zullen worden. Maar het publiek is ook gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecyclus en optimale condities voor dierenwelzijn en gezondheid.

Ecologisch

Een gesloten productiecyclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

5.1 lid1c

Tenslotte kunnen ook de proefdieren; glasaal en schieraal uit de natuur en voedende larven uit eigen kweek, worden beschouwd als stakeholders binnen dit project. De paling zelf heeft baat bij het verlagen van de visserijdruk op de natuurlijke populatie, het verbeteren van dierenwelzijn en het verhogen van de vitaliteit van de larven.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Stimulering van afrijping

Wilde glasaal is nog altijd het uitgangsmateriaal voor een gesimuleerde levenscyclus waarin we in 1,5 jaar goede moeders kunnen maken via feminisering (Chai et al., 2010), de juiste voeding en gesimuleerde migratie (Mes et al., 2016). Met wilde vrouwelijke schieralen als positieve controles worden ze tot afrijping gebracht door hypofysatie (wekelijkse injecties met hypofyse extract - CPE) toe te passen (Palstra et al., 2005). Tenslotte wordt de ovulatie geïnduceerd met een DHP (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) injectie. Wilde mannelijke schieralen kunnen met een enkele hCG (human chorionic gonadotropin) injectie tot afrijping worden gebracht waarna een tweede injectie

zorgt voor goed kwaliteitssperma. Ouders worden gestript, eieren worden bevrucht en vervolgens gevolgd in hun ontwikkeling na uitkomen van de eieren. Ondermaatse vitaliteit van de larven voorkomt de volgende stap om de larven op voer te krijgen vanaf 15 dagen na uitkomen van de eieren onder de huidige condities. Die step is essentieel in de productie van een eerste generatie glasaal dat uitgangsmateriaal vormt voor het sluiten van de productiecycli.

Eikwaliteit

Om vitale larven te verkrijgen zal allereerst de eikwaliteit verbeterd moeten worden. Dat kan enerzijds door verfijning in conditionering van de ouderdieren. 5.1 lid2f

Anderzijds kan de eikwaliteit verbeterd worden door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën. 5.1 lid2f

Nachtelijke paai activiteiten zullen worden gemonitord door toepassing van accelerometer sensoren. Tot slot moet eikwaliteit gefenotypeerd kunnen worden om uitspraken te kunnen doen over de kwaliteit van de betreffende eibatch, het succespercentage te kunnen voorspellen en mogelijk zelfs tot selectie van goede eieren over te kunnen gaan. 5.1 lid2f

Larvenvitaliteit

Naast verbetering van de eikwaliteit, kan verbetering van de larvale vitaliteit allereerst bereikt worden door aanpassingen in hatchery en nursery condities. Optimalisaties zullen niet alleen voor paling van belang zijn maar ook voor andere pelagische vissoorten die miljoenen eieren kunnen afzetten maar met minimale investering in elk van die eieren zodat de larven zeer kwetsbaar zijn (bv. tonijn- en makreelsoorten). Kweeksystemen voor elk van de opvolgende fasen (eieren; vroege inactieve larven; actieve en voedende larven in Kreisel tanks - Okamura et al., 2009) moeten constant worden geoptimaliseerd om aan de eisen van de larven tegemoet te komen. Temperatuur, licht en saliniteit spelen een belangrijke rol (Politis et al., 2014, 2017, 2018) en waarschijnlijk geldt dat ook voor dichtheden, waterkwaliteitsparameters en zuurstofgehalten. De aanzienlijke kennis en ervaring met opkweek van mariene soorten binnen 5.1 lid2h zal bijdragen aan het innoveren en optimaliseren van de kweeksystemen.

Fenotypering van de larvale kwaliteit en bestudering van de fysiologische mechanismen die een rol spelen in de larvale ontwikkeling en overleving zal moeten plaatshebben om de origine van abnormaliteiten in kaart te kunnen brengen. Bovendien kan die larvenkwaliteit vervolgens worden geassocieerd met afkomst, eikwaliteit, kweeksystemen en -condities zodat er ook naar oplossingen gestreefd kan worden. 5.1 lid2f

- Larvale voedingsproeven (T2.c-3, leidend tot M15)

Referenties

- Chai Y., Tosaka R., Abe T., Sago K., Sago Y., Hatanaka E., Ijiri S. and Adachi S. (2010) The relationship between the developmental stage of oocytes in various seasons and the quality of the egg obtained by artificial maturation in the feminized Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture Sci.* 58, 269-278.
- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Giménez Nebot, I., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Komen, H. (2021a) First European eel larvae produced using recombinant FSH and LH - in vivo and in vitro effects on oocyte maturation and reproductive success. *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.
- Jéhannet, P., Palstra, A.P., Heinsbroek, L.T.N., Kruijt, L., Dirks, R.P., Swinkels, W., Komen, H. (2021b) What goes wrong during early development of artificially reproduced European eel *Anguilla anguilla*? Clues from the larval transcriptome and gene expression patterns. *Animals* 11, 1710.
- Masuda, Y., Yatabe, T., Matsunari, H., Furuita, H., Kamoshida, M., Shima, Y., Kuwada, H. (2016) Rearing of larvae of Japanese eel *Anguilla japonica* to metamorphosis into glass eel by feeding with fish protein hydrolysate-based diets. *Nippon Suisan Gakkaishi* 82(2): 131-133.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367-372.
- Miller, M.J., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Yamada, Y., Tsukamoto, K., Ohkouchi, N. (2013) A low trophic position of Japanese eel larvae indicates feeding on marine snow. *Biol. Lett.* 2013 9, 1-5.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y. (2007) Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. eds. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Dordrecht: Springer pp. 437-476.
- Nguyen AT, Chia JHZ, Kazeto Y, Wylie MJ, Lokman PM. (2020) Induction of oocyte development in previtellogenic eel, *Anguilla australis*. *General and Comparative Endocrinology* 291, 113404.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Tanaka, S., Kobayashi, H., Tsukamoto, K. (2013) Hen egg yolk and skinned krill as possible foods for rearing leptocephalus larvae of *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. *Aquaculture Research* 44, 1531-1538.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horita, T., Horie, N., Mikawa, N., Utoh, T., Tanaka, S., Tsukamoto, K. (2009) Rearing eel leptocephali (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) in a planktonkreisel. *Aquaculture Research* 40, 509-512.
- Palstra, A.P., Bouwman, L.J., Jéhannet, P., Kruijt, L., Schipper, H., Blokland, M.H., Swinkels, W.S., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M. (2021) 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol implant effects on the induction of vitellogenesis in feminized European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.
- Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S. (2020) First observation of a spontaneously matured female European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific Reports* 10: 2339
- Politis SN, Butts IAE, Tomkiewicz J (2014) Light impacts embryonic and early larval development of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 461, 407-415,
- Politis SN, Mazurais D, Servili A, Zambonino-Infante J-L, Miest JJ, Sørensen SR, et al. (2017) Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS ONE* 12(8): e0182726.
- Politis SN, Mazurais D, Servili A, Zambonino-Infante J-L, Miest JJ, Tomkiewicz J, et al. (2018) Salinity reduction benefits European eel larvae: Insights at the morphological and molecular level. *PLoS ONE* 13(6): e0198294.
- Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), *Eel Biology*, Springer, Heidelberg pp. 427-434.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

In de afgelopen vijf jaar hebben we uitstekende onderzoeksfaciliteiten weten te realiseren. We hebben de conditionering van ouderdieren verbeterd zodat we in 1,5 jaar van juveniele glasaaltjes goede ouderdieren kunnen maken die gewend zijn aan hanteren en houderij. Hiermee zijn we niet meer afhankelijk van wilde ouderdieren die tenminste 7 tot wel 50 jaar oud zijn, stress hebben door vangst en transport, ziektes meebrengen en soms hoge mortaliteit vertonen. Daardoor kunnen we nu zowel larven produceren van wilde alen als van geconditioneerde alen met gelijke efficiëntie. Inmiddels produceren we twee keer per week gecontroleerd tot wel 100,000 palinglarven die tot 25 dagen in leven blijven. Ei- en larvenkwaliteit is echter nog laag en zeer variabel. Embryo mortaliteit is hoog en hatching percentages zijn laag. Na 15 dagen zouden de larven in staat zijn om te gaan eten maar ook de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats, ze overleven de eerste week niet en/of ze vertonen afwijkingen/misvormingen. Om de larven tot exogeen voeden aan te zetten zullen we op dat moment nog duizenden vitale larven moeten hebben aangezien voedingsgedrag dichtheid-afhankelijk lijkt. Een uitgebreidere beschrijving is toegevoegd als de bijlage "kennis, innovaties en tools vanuit het internationaal paling reproductie onderzoek en het 5.1 lid2h periode 2016-2021" onder documenten.

Hoewel taken elkaar opvolgen in het reproductieproces kunnen ze onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Het uitvoeren van een volgende taak is dus niet specifiek afhankelijk van het succes van een eerdere taak. Er is dus geen sprake van go/no go momenten, alleen momenten waarin wordt afgewogen of een innovatie wel of niet onderdeel wordt van het standaard reproductieprotocol.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven
2	Monsterafname van voedende larven



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Appendix 1 betreft de stimulatie van ouderdieren voor productie van eieren en larven. Ouderdieren betreffen hier gefeminiseerde en wilde vrouwelijke ouderdieren en mannelijke wilde ouderdieren. Stimulatie betreft het traject van schieraal tot gematureerde aal, het tot afrijping brengen. Enerzijds brengen we dieren tot afrijping om zo eieren en larven te produceren om daaraan te meten. Anderzijds proberen we de eikwaliteit te verbeteren door verfijning in de conditionering van de ouderdieren, en door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën. Die testen worden in de tijd herhaald om zo verder te kunnen optimaliseren.

Vrouwelijke schieralen worden tot afrijping gebracht door hypofysatie (wekelijkse intramusculaire injecties van hypofyse extract) toe te passen (Palstra et al., 2005). Tenslotte

wordt de ovulatie geïnduceerd met een 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) injectie. Wilde mannelijke schieralen kunnen met een enkele hCG (human chorionic gonadotropin) injectie tot afrijping worden gebracht waarna een tweede injectie zorgt voor goed kwaliteitssperma. Het afrijpen van de vrouwtjes wordt geïnduceerd door een toename in het gewicht vanwege een hydratatie respons van de oocyten. Zodra gewichtstoename meer dan 20% bedraagt wordt de finale maturatie en ovulatie geïnduceerd. Gameten van mannetjes en vrouwtjes worden vervolgens afgestroken en bevrucht.

5.1 lid2f

verige dieren worden dan tot afrijping gebracht om vervolgens reproductiesucces (aantal injecties tot maturatie, eikwaliteit, larvenvitaliteit) te kunnen correleren aan behandeling. 5.1 lid2f

Primaire uitkomstparameters betreffen gonadenhistologie, hormoonniveaus en genexpressie langs de reproductieve as hypothalamus-hypofyse-lever-gonaden. De parameters die worden gemeten stellen de onderzoekers in de staat de maturatie status vast te stellen en daarmee verschillen tussen groepen ten aanzien van de gestelde vraag te kunnen duiden. De proef is geslaagd als de vraag, positief of negatief, beantwoord kan worden. Gonadenmassa wordt bepaald door tijdens de dissectie beide gonaden te wegen. In relatie tot het lichaamsgewicht geeft dit de GSI. Gonadenhistologie zal in staat stellen het ontwikkelingsstadium te duiden. Hormoonniveaus in de gonaden, met name van androgene en oestrogene steroïden, en enzymen als aromatase die omzetting realiseren, worden gemeten (ELISA en/of RIA) en de genexpressie van aromatase en steroïdreceptoren wordt dan bepaald. Circulerende hormoonniveaus worden bepaald in plasma en genexpressie wordt bepaald (qPCR en/of RNAseq) in de gonaden en langs de reproductieve as hypothalamus (e.g. Gonadotropin Releasing Hormone - GnRH) - hypofyse (e.g. LH, FSH) - lever (e.g. oestradiol receptor, vitellogeninen).

5.1 lid2f

Reproductiesucces zal worden gecorreleerd aan de behandelingen. 5.1 lid2f

5.1 lid2f

De hatching assays zijn wells platen waarin een 100 tal individuele eieren wordt gehouden om zo percentueel te kunnen bepalen welke eieren wanneer stoppen met ontwikkelen en welke uiteindelijk uitkomen (hatchen). 5.1 lid2f

5.1 lid2f

De vitaliteit van individuele larvenbatches wordt bepaald door inschatting van aantallen, bepaling van mortaliteit en monitoring van deformaties. De vitaliteit wordt gekoppeld aan het type systeem en de condities, aan de aanpassingen in beiden en experimentele behandelingen met antibiotica, desinfectie methoden en verlaging van saliniteit. Net als voor de eikwaliteit zullen we larvale kwaliteit karakteriseren door histologische en fysiologische bestudering.

Succesvolle verbetering van eikwaliteit en larvenvitaliteit zal zich uiten door het produceren van tenminste 5000 larven zonder abnormaliteiten op dag 15 wanneer met exogeen voeden zou moeten worden begonnen. Monsterafname van deze voedende larven wordt beschreven in appendix 2.

Referenties

Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547.

Palstra, A.P., Bouwman, L.J., Jéhannet, P., Kruijt, L., Schipper, H., Blokland, M.H., Swinkels, W.S., Heinsbroek, L.T.N., Lokman, P.M. (2021) 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol implant effects on the induction of vitellogenesis in feminized European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Europe*, October 4-7, Funchal, Madeira, Portugal.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Bij aanvang van hormonale stimulatie zullen alle vrouwelijke alen éénmalig verdoofd worden en geïnjecteerd worden met een PIT ID tag (Trovan). Vervolgens vinden biometrische metingen plaats (lengte, gewicht, lichaamsomtrek en oogdiameters).

In het geval dat dieren deel uitmaken van een steroid implantaat of hCG test wordt ook een

5.1 lid2f

5.1 lid2f

5.1 lid2f

5.1 lid2f

Referenties

Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547.

Sørensen, S.R., Tomkiewicz, J., Munk, P., Butts, I.A.E., Nielsen, A., Lauesen, P., Graver, C (2016) Ontogeny and growth of early life stages of captive-bred European eel. *Aquaculture* 2016, 456, 50–61

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Bepaling van het aantal dieren per groep (voor dissectie en monsterafname) is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiële reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	89 - Other Fish*	05	juveniel	1600	vrouw	nvt	nvt
2	89 - Other Fish*	05	juveniel	534	man	nvt	nvt

Provide justifications for these choices

Species

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla* aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort.

Origin

5.1 lid2f

Life stages

De juvenielen worden in de eigen faciliteiten opgekweekt to broodstock dieren. De wilde broodstock dient als positieve controle en als uitgangsmateriaal voor ei- en larvenproductie aangezien reproductief success hoger ligt.

Number

De meest recente resultaten over 2021 laten zien dat we inmiddels 84% van de vrouwtjes paling waarmee we de stimulatie starten tot volledige maturatie kunnen brengen. Van 77% van deze dieren krijgen we eieren en van 57% larven. Deze percentages zijn als uitgangspunt genomen voor de bepaling van de aantallen benodigde dieren in deze aanvraag. Voor dissectie wordt N=10 aangehouden zoals beargumenteerd onder A. Voor het aantal vrouwen per taak geldt:

5.1 lid2f

5.1 lid2f

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

5.1 lid2f



In totaal zijn dus 1600 vrouwelijke dieren en 534 mannelijke dieren nodig, het totaal aantal dieren betreft dan 2134 dieren.

	experimentele dieren		
TAAK	vrouwtjes	mannetjes	larven
T1.a-1	224		
T1.a-2	224		
T1.a-3	108		
T1.b-1	108		
T1.b-2	108		
T1.b-3			
T1.c-1	18		
T1c-2	54		
T2.a-1			
T2.a-2	144		
T2.a-3	72		
T2.b-1			
T2.b-2	180		
T2.c-1			
T2.c-2			
T2.c-3	360	534	2000
totaal	1600	534	2000

Gender

Zowel mannen als vrouwen zijn nodig voor de productie van nakomelingen.

Genetic
alterations
nvt

Strain
nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Dieren kunnen ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Stress tgv hanteren; éénmalige of wekelijkse injectie met hormonen, implantaten of van een PIT tag; bloedafname; het afstrijken van gameten.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Goede dierverzorging tracht effecten te minimaliseren. Verdoving wordt toegepast voorafgaand aan meting en behandeling.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Licht ongerief door het vangen en licht verdoven; het meten en wegen; de stress die optreedt door hanteren; het injecteren; en het doden. Bij bloedafname en het geven van 12 of meer wekelijkse injecties wordt ingeschat dat het cumulatieve ongerief matig is. Dit geldt voor 36% van de vrouwelijke dieren, bij overige dieren wordt geen bloed afgenomen en/of is het aantal wekelijkse injecties lager dan 12. Mannelijke dieren ondervinden licht ongerief van de twee injecties die in totaal worden toegediend en het afstrijken van gameten. De experimentele opstellingen zelf leveren geen of onderdrempelig ongerief. Het cumulatieve ongerief van het totaal aantal dieren is voor 1568 dieren mild en voor 576 dieren matig.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen.

Reduction

In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.

Refinement

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zal de seksuele maturatie en reproductie als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol. Door toepassing van de langzaam uitlekkende hormoonpreparaten hebben we het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes (en daarmee ook het wekelijkse verdoven en hanteren) weten te reduceren van gemiddeld 14 naar 8. Voor de mannetjes geldt een bestaand protocol van wekelijkse injecties (tenminste 10) die we hebben kunnen vervangen door 2 injecties. Indien we meer kennis verzamelen over het natuurlijk stimuleren van de maturatie zullen injecties verder, of zelfs geheel, kunnen worden ingeperkt.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

nvt

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment**K. Destination of the animals**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Dieren worden ge-euthanaseerd door een overdosis phenoxy ethanol.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Voor de andere dieren geldt dat schieralen niet meer eten en dus uiteindelijk zullen sterven als ze niet onmiddellijk worden ge-euthanaseerd.



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Monsterafname van voedende larven

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Tenslotte zullen alle maatregelen voor het verhogen van de ei- en larvenkwaliteit zich moeten bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Daartoe zullen we larvale voedingsproeven doen met batches die hoge overleving vertonen, weinig abnormaliteiten vertonen en een hoge vitaliteit kennen op 15 dagen na hatching. Optimale diëten en voedingssystemen zullen daarvoor worden ontworpen.

Appendix 2 betreft de monsterafname van voedende larven, larven die actief zwemmen en voeding-zoekend gedrag vertonen vanaf dag 15 na uitkomen van het ei onder de huidige condities en succesvol foerageren op aangeboden voeding.

Voor deze taak kan een batch goede kwaliteitslarven op dag 15 worden opgesplitst om diverse diëten te testen, en vervolgens te optimaliseren. Daarbij wordt gedacht aan tenminste 5,000 vitale larven per batch. Hoeveelheden larven in een batch of bekerglas worden ingeschat op

basis van dichtheid. 5.1 lid2f

Respons en voedingsgedrag voor elk van die diëten zal worden gemonitord. Monsters zullen worden genomen om de larvale ontwikkeling te bestuderen. Die monsters worden genomen om een ontwikkelingsreeks in kaart te brengen van de start van exogeen voeden tot metamorfose naar glasaal hetgeen wordt verwacht op 200 tot 250 dagen na hatching.

Referenties Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), Eel Biology, Springer, Heidelberg pp. 427–434.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

5.1 lid2f

Zodra we larven op voer kunnen krijgen zullen monsters genomen worden en moet dit worden betiteld als dierproef. Larvenmonsters worden microscopisch onderzocht en gepreserveerd in formaline en RNA later voor histologisch en (in situ) genexpressie onderzoek.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Bepaling van het aantal dieren per groep (hier het aantal gemonsterde larven per tijdstip) is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	89 - Other Fish*	05	larvaal	2000	nvt	nvt	nvt

Provide justifications for these choices

Species

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla* aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort.

Origin

Herkomst betreft eigen kweek.

Life stages

De proefdieren zijn voedende larven die gemonsterd worden.

Number

Voor het testen van diëten wordt uitgegaan van 10 goed larvenbatches die worden geproduceerd van elk tenminste 5,000 larven. Nog eens 10 batches worden gebruikt voor monsterafname bestaande uit 10 tijdstippen: 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150 en 200 dagen na hatching. Voor elk tijdstippen worden 10 larven gemonsterd in twee diverse media – formaline en RNAlater) die worden gebruikt voor de monsterafnames. Larven die voedingzoekend gedrag vertonen maar niet eten worden ook in leven worden gehouden tot max. 18 dagen.

Zodoende zijn in totaal 2,000 voedende larven vereist (10 batches x 10 tijdstippen x 10 larven x 2 media – formaline en RNAlater) die worden gebruikt voor de monsterafnames. Larven die voedingzoekend gedrag vertonen maar niet eten worden ook in leven worden gehouden tot max. 18 dagen.

Er is dus sprake van twee aantallen. Allereerst moet op dag 15 sprake zijn van een batch van 5000 larven om een voedingsexperiment te kunnen doen. Dan worden per batch vervolgens max 2000 larven in een reeks gesampeld.

Gender

nvt

Genetic alterations

nvt

Strain

nvt

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Met de voedingsproeven wordt onderzocht aan welke behoefte moet worden voldaan zodat de larven in leven blijven, hetgeen zich bewijst in het exogeen voeden van de larven.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

Dieren kunnen ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdooving.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten. De professionele diervverzorgers zorgen voor optimale systeemomstandigheden en waterkwaliteit condities. Bovendien monitoren ze de larven dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Larven hangen in eerste instantie verticaal in de waterkolom. Larven die dan in cirkeltjes zwemmen zijn afwijkend en worden ge-euthanaseerd. Later vertonen de larven actief zwemgedrag, afwijkende larven zouden dan sterven.

E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Simulatie niet mogelijk, alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.

Reduction

In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.

Refinement

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Ook hier zal elke vorm van stress nadelig zijn voor het experimentele resultaat. Er wordt geen ongerief verwacht.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.
nvt

J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Euthanasie voor monsterafname. Overige larven worden verder opgegroeid.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Overdosis verdoving met phenoxy ethanol.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

nvt

Naam van het project	Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)
NTS-identificatiecode	NTS-NL-862362 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202215973
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	paling voortplanting eikwaliteit vislarven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Ethologie/diergedrag/dierbiologie

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Het sluiten van de productiecycclus van de paling kan zowel een duurzame aquacultuur realiseren als bijdragen aan een duurzaam natuurlijk bestand. We produceren inmiddels drie keer per week tot wel 100,000 palinglarven maar de vitaliteit van die larven is nog vaak ondermaats. Dit project heeft het specifieke doel om nieuwe reproductietechnologieën te ontwikkelen voor de productie van vitale larven. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Migrerende soorten die net als de paling van belang zijn voor consumptie, maar waarbij het scheppen van kweekmogelijkheden ook van belang is voor instandhouding van de natuurlijke populaties.</p> <p>De innovatieve technologieën zijn gericht op verbetering van de eikwaliteit door verfijning in het stimuleren van de ouderdieren; optimalisatie en synchronisatie van eicelrijping en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën, en typering van de eikwaliteit. Maar ook direct op verbetering van de larvenvitaliteit door aanpassingen in opgroeicondities; typering van de larvale kwaliteit en bestudering van de mechanismen achter larvale ontwikkeling en overleving, en tenslotte formulering van optimale diëten, ontwerpen van voedingssystemen en ultieme bewijsvoering door het doen van larvale voedingsproeven.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrerende soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.</p> <p>Het publiek is gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. Een gesloten productiecycclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke</p>

populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Vrouwtjespaling wordt tot afrijping gebracht door wekelijkse hormooninjecties (8-14 injecties). Bij gewichtstoename zullen dieren worden gewogen om te bepalen of de eitjes opzwellen (max 8 keer), uiteindelijk zal ook een monster worden genomen om het ontwikkelingsstadium te bepalen. Als dieren klaar zijn om af te rijpen krijgen ze een extra hormooninjectie en een injectie met een hormoon om de ovulatie te stimuleren waarop dieren eitjes gaan afgeven. Getest wordt of deze periode kan worden ingekort en of de eikwaliteit kan worden verbeterd door gebruik van palingspecifieke hormonen of eenmalige injectie van hormoonimplantaten. Dieren worden dan doorgemeten op externe en interne kenmerken (door het maken van een echo) en een deel van de dieren wordt gebruikt voor dissectie. Mannetjes worden tot afrijping gebracht door een eenmalige hormooninjectie. Bij het afgifte van sperma ontvangen ze nog een injectie ter verhoging van de spermakwaliteit. Tenslotte worden de eitjes en sperma van mannetjes en vrouwtjes afgestreken en bevrucht. Daartoe wordt de buikholte licht gemasseerd. Ontwikkelende eitjes komen uit en de larven ontwikkelen dan door tot 15 dagen na uitkomen. Dan zouden larven kunnen eten en wanneer ze dat doen zullen larven worden gemonsterd om de ontwikkeling te bestuderen.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Ouderdieren kunnen stress ondervinden tgv hanteren; éénmalige of wekelijkse injectie met hormonen, implantaten of van een PIT tag ('Passive Integrated Transponder', een kleine implanteerbare transponder voor individuele identificatie); bloedafname, en het afstrijken van gameten. Bij alle handelingen worden dieren licht verdoofd. Voedende larven ondervinden licht ongerief door het vangen, microscopisch observeren en euthanasie door overdosis verdoving.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Andere vissen (other Pisces)</td> <td>4144</td> <td>0</td> <td>3568</td> <td>576</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Andere vissen (other Pisces)	4144	0	3568	576	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Andere vissen (other Pisces)	4144	0	3568	576	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Dieren worden gedood voor dissectie en monsterafname. Overige dieren worden na gebruik ook gedood omdat schieralen niet meer eten en zodoende uiteindelijk zouden sterven. Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om hongeringseffecten en uiteindelijke uithongering voorkomen. Overige larven die eten en niet voor monsterafname worden gedood worden verder opgegroeid.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen. Ook zijn alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zullen de seksuele maturatie, reproductie en larvale ontwikkeling als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol.
Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe	De experimentele vissoort betreft de Europese aal <i>Anguilla anguilla</i> aangezien de onderzoeksvragen specifiek van toepassing zijn op deze vissoort. De stadia betreffen afrijpende ouderdieren (schieralen) en voedende larven.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

B

Datum 30 mei 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215973

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL)
Aanvraagnummer: AVD202215973
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>De volgende vraag is gesteld aan de DEC:</p> <ul style="list-style-type: none">- In uw geplaatste kanttekening geeft u aan dat u zich afvraagt of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot? Het is echter niet duidelijk wat de inhoud van de discussie was. Kunt u inzicht geven die hoort bij deze kanttekening? <p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none">- U schrijft in het projectvoorstel bij het uiteindelijke doel dat u de mogelijkheid om kunstmatig geproduceerde glasaal te gebruiken voor uitzetting kan worden onderzocht. Dit sluit niet aan bij het onmiddellijk doel wat u momenteel onderzoekt. Kunt u de stukken over het uitzetten en de mogelijke impact erdoor op de wild populatie uit het projectvoorstel en de NTS halen?- Het doel van dit project is gericht op het sluiten van de cyclus en het niet meer nodig hebben van wildvang voor de commerciële kweek, wat een fundamenteel doel is. In uw projectvoorstel geeft u onder 2.1 drie doelcategorieën weer (fundamenteel, translationeel en behoud van diersoort). In de NTS geeft u twee doelcategorieën aan (fundamenteel en translationeel). De doelcategorieën translationeel en behoud van diersoort sluiten niet aan bij het onderzoek wat in dit projectvoorstel is aangevraagd. Kunt u in beide documenten de doelcategorie aanpassen zodat deze aansluit bij het onmiddellijke doel van het onderzoek?- U heeft in bijlage 1 van de dierproeven het cumulatieve ongerief per geslacht weergegeven. Kunt u in deze bijlage aangeven wat het
---------------	--

cumulatieve ongerief van het totaal aantal dieren is?

- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u aan dat de dieren gehouden worden volgens de bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. In deze richtlijn staat dat de huisvesting van de dieren moet zijn afgestemd op de fysiologische en ethologische behoeften van de daarin gehouden soorten. Met de voedingsproeven gaat u onderzoeken aan welke behoefte moet worden voldaan zodat de larven in leven blijven, en zich bewijzen in het exogeen voeden van de larven. Kunt u aanpassen dat de dieren niet worden gehouden volgens de richtlijn?

- In bijlage 2 van de dierproeven geeft u onder K aan dat de overige larven verder worden opgegroeid. Dat er dieren de proef zouden overleven is niet terug te lezen in de NTS. Kunt u de documenten in overeenstemming met elkaar brengen?

De volgende vragen zijn gesteld over de NTS:

- In de NTS noemt u het **5.1 lid2h** . De NTS dient anoniem te zijn. Kunt u de naam van de instelling uit de NTS verwijderen?

- In de NTS gebruikt u woorden die voor een algemeen publiek lastig te volgen zijn. Kunt u de woorden vereenvoudigen zodat de NTS ook voor leken te lezen is?

- In de NTS onder het tabblad 'expected harms' heeft u drie keer de categorie other fish gebruikt. Voor het publiceren op de Europese website mag elke categorie op dit tabblad maar een keer zijn ingevuld. Kunt u deze aantallen bij elkaar optellen en een keer weergeven onder deze categorie?

- In NTS schrijft u "Ook larven die niet spoedig eten worden gedood om uiteindelijke dood voorkomen". Kunt u deze zin in de NTS voor het publiek verduidelijken?

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven				
	Andere vissen (andere Pisces)	Europese aal	2.134	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn Dieren in/uit het wild Bedreigde dieren
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven				
	Andere vissen (andere Pisces)	Europese aal (larvaal)	2.000	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Bedreigde dieren

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

In bijlage 1 van de dierproeven gebruikt men dieren uit een palingkwekerij en dieren uit het wild.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat A9 vraag DEC: De DEC vraagt zich af wat er met het afvalwater uit het project gebeurt. Dit is verontreinigd met o.a. antibiotica en hormonen.</p> <p>Citaat A9 antwoord aanvrager: Wij verwachten geen verontreiniging van afvalwater met hormonen. Gonadotropines hebben een zeer korte halfwaardetijd (minuten) en spelen dan geen rol. De halfwaardetijd van steroïden is langer (uren-dagen) maar de verontreiniging is niet significant. Collega's van de Leiden Universiteit hebben estradiol gemeten in het afvalwater van estradiol gevoerde paling maar die niveaus waren lager als in het tapwater. Overigens scheiden de maturerende vissen zelf ook op natuurlijke wijze hormonen af dus een onderscheid is niet of nauwelijks te maken. Antibiotica wordt gebruikt in zeer lage hoeveelheden aangezien de watervolumes waarin de eieren en larven worden gehouden laag zijn. Vervolgens wordt door verdunning van het afvalwater de verontreiniging zeer beperkt. Aangezien er ja of nee moet worden beantwoord is er met 'nee' beantwoord onder 'adverse</p>
-------------------	--

environmental effects') hetgeen geen ruimte biedt om verdere uitleg toe te voegen.

Citaat C6: Voor zover de DEC dat kan inschatten en zoals uit de antwoorden van de onderzoeker blijkt is de DEC niet unaniem van mening dat er geen aanleiding is om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. Met name één van de DEC-leden houdt zorg over de verontreiniging van het afvalwater en is van mening dat de onderzoekers hier te lichtzinnig over denken. Ook al wordt de antibiotica in het afvalwater zeer verdund en is het risico van verontreiniging zeer beperkt, het risico is er wel! Ook de korte halfwaardetijd van de hormonen is wat dit DEC-lid betreft onvoldoende reden om de effecten op het milieu niet in twijfel te trekken. Ook na een korte halfwaardetijd blijft de andere helft nog onveranderd aanwezig en hoe jet dan is afgebroken kan op zichzelf ook schadelijk zijn. (Bekend is dat het eten van vlees van dieren die met hormonen zijn behandeld ook na de wachttijd toch schadelijk is). Dit DEC-lid geeft aan dat het als voorwaarde voor vergunning graag ziet dat het afvalwater in voldoende mate gezuiverd wordt voordat het in het afvalwatersysteem geloosd wordt.

Citaat C8: De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Echter, de DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica. Hoewel de onderzoekers aangeven dat het niet de bedoeling is dat dit voor de praktijk ontwikkeld zal worden is het blijktbaar op dit moment wel noodzakelijk om preventief antibiotica in te zetten om de larven in leven te houden. De verleiding is dan ook groot om bij succes in productie van glasaal, dit in stand te houden, mochten er geen alternatieven te bewerkstelligen zijn. Ook het gegeven, dat de onderzoeker een aantal verschillende antibiotica wil testen stemt de DEC niet hoopvol. Als je uiteindelijk toe wil naar een antibioticavrije productie van glasaal, lijkt de DEC de start hiernaar essentieel. Echter, het betreft hier ook wetenschappelijk onderzoek (in een kleine setting) in het hele traject van reproductie-ei-larve-glasaal. Op die gronden is de insteek van de onderzoeker te billijken, ondanks het gebruik van antibiotica, wat tot nu toe het enige is, dat succesvol blijkt in de overleving van glasaal, om ook tevens onderzoek te doen naar de ontwikkeling van ei tot glasaal. De DEC zou liever zien dat de onderzoeker op basis van Good Veterinary Practice antibiotica therapeutisch inzet en dus eerst diagnostiek bedrijft en aan de hand daarvan een keuze maakt voor meest effectieve antibiotica. Verder

zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting.

Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4), paling staat op de Europese rode lijst
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Op dit moment is palingkweek van Europese aal in gevangenschap nog niet mogelijk dus moeten glasaaltjes uit het wild gebruikt worden. De dieren uit bijlage 1 worden gebruikt in bijlage 2, maar de DEC vraagt zich af of dit als hergebruikt geclassificeerd moet worden.

Citaat C14: De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Er zijn geen alternatieven om deze proeven zonder dieren uit te voeren. Er is wel een maatschappelijk alternatief: paling wordt gezien als een luxeproduct (vergelijk bont/nertsenhouderij) en niet een noodzakelijke voedselbron. Stoppen met eten van paling zou dit soort onderzoek overbodig maken.

Citaat C18: De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is: voor het bereiken van de doelstellingen van het onderzoek zijn meer vrouwelijke dan mannelijke dieren nodig.

Citaat C20: Op een vraag van de DEC over hergebruik van de dieren heeft de onderzoeker geantwoord dat de dieren, analoog aan de vrije natuur na verloop van tijd stoppen met eten waardoor ze sterven aan hongerdood. Om dit te voorkomen worden de dieren na de experimenten gedood.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt onderzoek naar reproductietechnologieën om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, het maximaal matige ongerief van 1957 juveniele alen en 2000 exogene voedende larven?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende

samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan een meer duurzame palingteelt in Nederland. Bij de ethische afweging is de DEC van mening dat het directe doel en het uiteindelijke doel ver uit elkaar liggen en dat het project ook bij kan dragen aan soortbehoud (ook een uiteindelijk ver weg liggend doel).

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren hebben een negatief welzijnsbelang van reëel morele waarde als gevolg van de handelingen in de experimenten. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
- De palingen in het wild hebben een ecologisch voordeel van reëel morele waarde wanneer er minder glasaal gevangen hoeft te worden t.b.v. de commerciële palingkweek. Ook het niet in gevangenschap hoeven leven ziet de DEC als een belang van reële morele waarde
- De palingen die gekweekt worden t.b.v. de commerciële palingkweek hebben geen voordeel.
- De branchorganisatie/viskwekers hebben een groot commercieel belang van beperkte morele waarde wanneer zij gebruik kunnen maken van gekweekte glasaal en niet afhankelijk zijn van wildvang.
- De onderzoekers/^{5.1 lid2h} hebben een reëel wetenschappelijk belang van reële morele waarde.
- Daarnaast heeft de ^{5.1 lid2h} een reëel economisch belang omdat het contract research onderzoek betreft. De DEC waardeert dit als een belang van geringe morele waarde.
- Het ecosysteem heeft in de ogen van de DEC een belang van beperkte morele waarde bij minder vangst van wilde glasaal.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de meerderheid van de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale palinglarven, die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet met maximaal matig ongerief voor maximaal 4134 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De DEC is van mening dat de haalbaarheid van het project groot is en dat het zeer zeker kennis zal opleveren. Echter, het is geen totaaloplossing.

Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen stelt over het aantal dieren, antibioticagebruik, diersoort en afvalwater (milieufactoren)

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op meerderheid van stemmen.

Citaat D3: [...]Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag.[...]

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat: Onderstaande kanttekeningen zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

- De DEC vraagt zich af of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is. Kan dit gezien worden als een invasieve exoot?
- De onderzoeker heeft aangegeven dat men voor de commerciële houderij niet wil werken met veel hormoon- en antibioticagebruik zoals in het project gedaan wordt, maar de DEC vraagt zich af welk risico men loopt dat de praktijk toch op het onderzoek gaat lijken. Zij kan hier geen inschatting voor doen.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid.</p> <p>Citaat: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.</p>
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Het minderheidsstandpunt van het ene DEC-lid is goed te volgen en helder weergegeven.</p> <p>Onder C9 vraagt u zich af of het gebruik van de dieren uit bijlage 1 als hergebruik moet worden geclassificeerd voor het gebruik in bijlage 2. Dit hoeft niet als hergebruik worden geclassificeerd omdat de dieren in bijlage 1 geen handelingen ondergaan.</p> <p>Onder C11 schrijft u dat u het ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd vindt. De aanvrager geeft in bijlage 1 van de dierproeven dat alleen voor 36% van de vrouwen het cumulatief ongerief matig is. Het cumulatief ongerief voor de mannen, de overige 64% van de vrouwen en de larven uit bijlage 2 van de dierproeven heeft de aanvrager als licht ingeschat. Graag hadden we de onderbouwing van het licht cumulatief ongerief terug gezien bij C11.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: Dit project heeft het specifieke doel om productie van vitale Europese palinglarven mogelijk te maken, larven die in leven blijven, normaal ontwikkelen, goed groeien en die tot exogeen voeden kunnen worden aangezet. Het halen van dit doel is een fundamenteel biologische uitdaging die een integrale aanpak van expertises vereist om het oplossen van deze specifieke bottleneck in het sluiten van de productiecycclus mogelijk te maken. [...]</p> <p>Subdoelen Het beschreven doel wordt bereikt door zowel eikwaliteit als larvenvitaliteit te verbeteren. De eikwaliteit zal worden verbeterd: - door verfijning in conditionering van de ouderdieren; - door optimalisatie en synchronisatie van oocyt maturatie en ovulatie door verfijning in de hormoonstrategieën; - door het op grote schaal kunnen fenotyperen van de eikwaliteit. De larven vitaliteit zal worden verbeterd : - door aanpassingen in hatchery en nursery; - door het achterhalen van de fysiologische mechanismen die van belang zijn voor larvale ontwikkeling en overleving; - door het kunnen fenotyperen van de larvale kwaliteit. Succesvolle larvale voedingsproeven zullen vervolgens aantonen dat bovenstaande subdoelen zijn bereikt. Het verbeteren van eikwaliteit en larvenkwaliteit zou zich moeten vertalen naar grote aantallen etende larven van goede kwaliteit. Daarmee zijn succesvolle voedingsproeven een validatie van de geboekte progressie.</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Technologisch De ontwikkeling van de beoogde reproductietechnologieën zou een grote stap betekenen in het sluiten van de productiecycclus van de paling. Zo kan worden bijgedragen aan het verbeteren van vermeerderingstechnieken, resulterend in verbeterde prestatie, productie en consumentenacceptatie, en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid. De kennis en technieken zijn generiek en kunnen ook worden toegepast voor reproductie van andere, lastig-te-reproduceren, maar commercieel belangrijke soorten zoals steur en tonijn. Net als bij paling wordt dan kweek, in plaats van beperkte opkweek, mogelijk en worden nieuwe aquacultuur sectoren leven ingeblazen. Reproductie onderdrukking speelt een belangrijke rol in het beletten van aquacultuurmogelijkheden, met name voor migrante soorten die grote afstanden zwemmen om bij de paaigronden te komen. Paling, steur en tonijn dus, maar ook zalm en forelsoorten die naast consumptie ook worden gekweekt voor uitzet. Ontwikkeling van generieke reproductietechnologieën draagt dus indirect maar ook direct bij aan</p>

	<p>instandhouding van natuurlijke populaties van kwetsbare vissoorten hetgeen een belangrijke bijdrage levert aan de aquatische biodiversiteit.</p> <p>Economisch Succesvolle kunstmatige reproductie (en dus productie van glasaal) levert direct voordeel aan 5.1 lid1c kweekbedrijven 5.1 lid1c doordat zij dan kunnen bijdragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege de schaarste hoge prijzen kent. Dit neemt een belangrijke maatschappelijke zorg weg en stelt het bestaansrecht van de ondernemingen veilig. De partners verwachten dat de resultaten uit het onderzoek zullen bijdragen aan een positievere beeldvorming op het gebied van consumptie van paling in Nederland. Er is een enorme markt in Nederland voor betaalbare palingproducten. Voor elke 1000 ton productie van paling komen er 100-150 arbeidsplaatsen bij. Door de beschikbaarheid van geproduceerde glasaal kan de productie aan de vraag worden aangepast.</p> <p>Sociaal Het publiek is gebaat bij behoud van de paling als gewilde consumptievis, de rijke cultuur en tradities die dat met zich meebrengt en de banen die gegenereerd zullen worden. Maar het publiek is ook gebaat bij verduurzaming van de sector, een aquacultuur in recirculatiesystemen met een gesloten productiecycclus en optimale condities voor dierwelzijn en gezondheid.</p> <p>Ecologisch Een gesloten productiecycclus maakt een aquacultuur mogelijk die niet meer afhankelijk is van de natuurlijke populatie. De druk op die natuurlijke populatie wordt geminimaliseerd hetgeen bijdraagt aan het natuurlijk herstel van de populatie en biodiversiteitsdoelen. Bovendien dient de mogelijkheid zich aan om kunstmatig gekweekte glasaal te gaan gebruiken voor uitzet en bijdrage aan de natuurlijke populatie. Die mogelijkheid is van groot belang voor de paling maar ook voor andere migrante vissoorten waarvan de natuurlijke populaties nagenoeg altijd onder druk staan vanwege de drastische ingeperkte habitatbereikbaarheid door stuwen, sluizen, gemalen etc. Het vinden van oplossingen voor die blokkades dient gepaard te gaan met goede uitzetmogelijkheden, mede bewerkstelligd door de nieuw ontwikkelde reproductietechnologieën.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is voldoende onderbouwd.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 DEC advies: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Deze onderzoeksgroep heeft al ruime ervaring met dit onderzoeksgebied.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden om te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: Simulatie is niet mogelijk, aangezien alleen de levende aal in staat is om gameten, bloed en/of weefsels te leveren. Of, in het geval van eieren en larven, gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling en voeding te kunnen bestuderen.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: Simulatie niet mogelijk, alleen voedingsproeven met levende aallarven mogelijk.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Vermindering zou dan de groepsgrootte verlagen onder het vereiste minimum voor vergelijking, of het aantal groepen verlagen zodat vragen niet meer beantwoord kunnen worden, of niet leiden tot het aantal benodigde ouderdieren om voldoende (kwaliteits)nakomelingen te produceren.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: Citaat: Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Immers zal de seksuele maturatie en reproductie als eerste nadelige impact ondervinden van stress. Daartoe wordt het hanteren van dieren tot een minimum beperkt en wordt gewerkt aan methodiek om het hanteren verder tot een minimum te beperken. Zo hebben we in de afgelopen vijf jaar het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes kunnen reduceren door gebruik te maken van langzaam uitlekkende hormoonpreparaten en voor mannetjes de wekelijkse injecties zelfs compleet kunnen vervangen door een enkele injectie. Verdere verfijning en vervanging van hormonale door natuurlijke stimulatie speelt in dit project een belangrijke rol. Door toepassing van de langzaam uitlekkende hormoonpreparaten hebben we het aantal wekelijkse injecties voor vrouwtjes (en daarmee ook het wekelijkse verdoven en hanteren) weten te reduceren van gemiddeld 14 naar 8. Voor de mannetjes geldt een bestaand protocol van wekelijkse injecties (tenminste 10) die we hebben kunnen vervangen door 2 injecties. Indien we meer kennis verzamelen over het natuurlijk stimuleren van de maturatie zullen injecties verder, of zelfs geheel, kunnen worden ingeperkt.</p>
	<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: Citaat: Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Ook hier zal elke vorm van stress nadelig zijn voor het experimentele resultaat. Er wordt geen ongerief verwacht.</p>
<p>3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	
<p>3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 27,0% Matig 73,0% Licht	
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Voor dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van palingen. Deze diersoort staat op de rode lijst. De dieren zullen deels uit het wild komen en deels van een palingkwekerij. De DEC vindt de keuze van de diersoort voldoende onderbouwd. 5.2 lid1

De aanvrager wil mannen gebruiken in een ratio 1:3 ten opzichte van vrouwen. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. 5.2 lid1

Alle dieren worden aan het einde van het experiment gedood. Voor dieren die gesampeld worden is doden vereist. De overige dieren in bijlage 1 van de dierproeven worden gedood. De dieren zullen na verloop van tijd stoppen met eten waardoor ze uiteindelijk sterven aan hongerdood. 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan drie soorten antibiotica te testen. De DEC ziet wel problemen met het preventief inzetten van antibiotica en kaart dit aan als dilemma. De DEC zou liever zien dat antibiotica therapeutisch wordt ingezet. Verder zou de DEC graag zien dat ook resistentie gemonitord wordt van het preventieve antibioticagebruik in deze onderzoekssetting. Eén DEC-lid heeft principiële bezwaren tegen het preventief gebruik van antibiotica en geeft een negatief advies voor specifiek onderdeel T2.a.-2 van de aanvraag. Dit DEC-lid

is van mening dat de onderzoekers te lichtzinnig denken over de verontreiniging van antibiotica in het afvalwater. 5.2 lid1

5.2 lid1

De DEC vraagt zich af of terugplaatsing van gekweekte aal wenselijk en relevant is en of dit kan worden gezien als een invasieve exoot. Het is echter niet duidelijk wat de inhoud van de discussie was. De uitkomst hangt mogelijk samen met de doelstelling 'behoud van de soort'. 5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

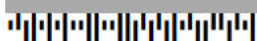


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

**Centrale Commissie****Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD 5.1 lid2h 202215973

Bijlagen

3

Datum 30 mei 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

CONCEPT

Geachte 5.1 lid2e

Op 5 april 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215973. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 juli 2022 tot en met 30 juni 2026.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure*Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h

(hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 5 mei 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 25 mei 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het doel, de huisvesting, het ongerief en de Niet-technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

30 mei 2022

Aanvraagnummer:

AVD 5.1 lid2n 202215973

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

30 mei 2022

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2n** 202215973

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



CONCEPT

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2022 tot en met 30 juni 2026, voor het project "Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)" met aanvraagnummer AVD^{5.1 lid2h}202215973, na advies van ^{5.1 lid2h}

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 april 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - 3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 5 mei 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 30 mei 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven			
	Andere vissen (andere Pisces) / Europese aal	2.134	27,0% Matig 73,0% Licht
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven			
	Andere vissen (andere Pisces) / Europese aal (larvaal)	2.000	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 202215973

door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202215973

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:AVD 5.1 lid2h 202215973

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202215973
Bijlagen
3

Datum 31 mei 2022
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e,

Op 5 april 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215973. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 juli 2022 tot en met 30 juni 2026.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 5 mei 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 25 mei 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het doel, de huisvesting, het ongerief en de Niet-technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

31 mei 2022

Aanvraagnummer:

AVD 5.1 lid2n 202215973

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

31 mei 2022

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2e** 02215973

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2022 tot en met 30 juni 2026, voor het project "Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARViAAL)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215973, na advies van 5.1 lid2h . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 april 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - 3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 30 mei 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 5 mei 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 30 mei 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Stimulatie ouderdieren voor productie van eieren en larven			
	Andere vissen (andere Pisces) / Europese aal	2.134	27,0% Matig 73,0% Licht
3.4.3.2 Monsterafname van voedende larven			
	Andere vissen (andere Pisces) / Europese aal (larvaal)	2.000	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 202215973

door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202215973

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:AVD 5.1 lid2h 202215973

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 3 juni 2022 14:50
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202215973

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 05-04-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Ontwikkeling van reproductietechnologieën voor de productie van vitale Europese palinglarven (LARVitAAL)' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215973.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het doel, de huisvesting, het ongerief en de Niet-technische Samenvatting.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 31-5-2022.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Onder C9 vraagt u zich af of het gebruik van de dieren uit bijlage 1 als hergebruik moet worden geclassificeerd voor het gebruik in bijlage 2. Dit hoeft niet als hergebruik worden geclassificeerd omdat de dieren in bijlage 1 geen handelingen ondergaan.

Onder C11 schrijft u dat u het ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd vindt. De aanvrager geeft in bijlage 1 van de dierproeven dat alleen voor 36% van de vrouwen het cumulatief ongerief matig is. Het cumulatief ongerief voor de mannen, de overige 64% van de vrouwen en de larven uit bijlage 2 van de dierproeven heeft de aanvrager als licht ingeschat. Graag hadden we de onderbouwing van het licht cumulatief ongerief terug gezien bij C11.

Het minderheidsstandpunt van het ene DEC-lid is goed te volgen en helder weergegeven. De CCD wilt u bedanken voor het inzicht in de discussie. De CCD sluit zich aan bij het meerderheidsstandpunt van de DEC.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl