



25 FEB. 2015

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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	21200
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	ATKB
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	2 7 1 7 7 1 4 9
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Poppenbouwing 34
		Postbus	-
		Postcode en plaats	4191NZ Geldermalsen
		IBAN	NL53RABO0160177529
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	AQUATERRA-KUIPERBURGER
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Projectleider
		Afdeling	Ecologie [REDACTED]
		Telefoonnummer	0 8 8 [REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]@at-kb.nl
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 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
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 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
- 2.3 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 einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 1 0 . 0 3 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 1 0 . 0 3 . 2 0 1 9 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------|
| Naam DEC | DEC-Consult |
| Postadres | - |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

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:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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 [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Geldermalsen

Datum 23 - 02 - 2015

Handtekening [REDACTED]



Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)."/>

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Op het juiste moment in de tijd (natuurlijke migratieperiode) zullen vissen op locaties waar knelpunten voorkomen (sifons, duikers, gemalen, vismigratievoorzieningen in diverse uitvoeringen) worden voorzien van PIT tags. De vissoorten worden betrokken van ter zake kundige beroepsvisser of worden gevangen door ervaren medewerkers van ATKB op de te onderzoeken locaties, stroomaf- en opwaarts van de voorziening/het knelpunt. Na vangst worden de vissen zo kort mogelijk (hooft 1 tot 2 dagen) in opslag genomen in grote visbekkens (1.500 l elk). De vissen worden tijdens deze kortdurende opslag niet gevoerd. Direct na vangst willen de vissen geen voeding tot zich nemen. Teven is een gevuld maag-darm stelsel onwenselijk voorafgaand aan het inbrengen van de PIT tag. De bekken zijn voorzien van een slangen en pompenstelsel waarmee er continu vers stromend water van de vangstlocatie wordt

aangevoerd, en waarmee de bekkens worden doorspoeld. Na vangst van de geschikte vis soorten (grootte- en gewichtskennmerken zijn hierbij doorslaggevend) zal een operatieploeg naar de merkllocatie vertrekken. Het gebruik van PIT tags bij vissen is vooral in Amerika veelvuldig toegepast. Uit buitenlandse literatuur blijkt dat het inbrengen van PIT tags niet of nauwelijks tot sterfte bij vissen leidt (>99% van de vissen blijft in leven). De vissen worden verdoofd met een oplossing van benzocaine. Nadat de vissen verdoofd zijn wordt een PIT tag met een zogenaamde 'handheld injector' met 'lock needle' in de buikholtte ingebracht. Voor elk te merken vis wordt een nieuwe 'lock needle' gebruikt. Hierbij wordt zo steriel als mogelijk gewerkt waarbij iedere PIT tag ontsmet wordt met alcohol. Tijdens het inbrengen van de PIT tag wordt er goed op gelet geen inwendige organen te raken. Direct na de procedure worden de vissen bijgebracht in een doorstroomd bassin met water van de locaties waar de vissen zijn gevangen. Vervolgens worden de vissen na een korte herstelperiode van de verdoving weer uitgezet in het water van herkomst. Per vis worden soort-, lengte, en de unieke code van de PIT tag genoteerd. Vervolgens zal de migratie van de vis starten. Op de tocht langs de te onderzoeken vismigratievoorziening/belemmering (vispassage, duiker, sifon, etc.). De PIT detectiestations (gelegen beneden- en bovenstroms van de betreffende vismigratievoorziening/belemmering) passeert de vis een of meerdere identiteit van de vis wordt tijdens de detectie vastgesteld en het tijdstip en de datum van detectie worden vastgelegd. Na verloop van tijd wordt de voornoemde informatie verzameld en geanalyseerd. Met de informatie kan exact voor elke individueel gemerkte vis en voor elke vissoort/lengteklasse apart worden nagegaan of de onderzochte vismigratievoorziening/belemmering ook werkelijk kan worden gepasseerd, en met welke mate van succes. Hoeveel van de gemerkte vissen weten de vismigratievoorziening/belemmering te passeren en kunnen na de paal wederom de vismigratievoorziening /belemmering in tegenovergestelde richting passeren? Ook kan per soort het mogelijke oponthoud bij de vismigratievoorziening/belemmering worden vastgesteld. Middels dit onderzoek ontstaat dus een goed beeld van de migratie van vis onder diverse omstandigheden. De vergaarde informatie kan de waterbeheerder, i.s.m. ecologische experts, helpen om bestaande vismigratievoorzieningen/belemmeringen te optimaliseren om zo vissen een 'vrije' doorgang te bieden tijdens hun migratie.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De benodigde vissen worden gevangen middels fuiken of zegens met knooploos want en kortdurend opgeslagen op de onderzoeklocatie in grote vistanks die continu doorstroomd worden met vers water. Elke individuele vis wordt in het stadium van chirurgisch verdoving gebracht door toepassing van een oplossing van benzocaine (40 mg/l). Nadat de vissen voldoende verdoofd (enkele minuten) zijn wordt een PIT tag ingebracht. Voor elk te merken vis wordt een nieuwe 'lock needle' gebruikt. Hierbij wordt zo steriel als mogelijk gewerkt (lock needles en PIT tags in alcohol). Er zal goed worden gelet om geen vitale organen te raken tijdens de procedure. Direct na de procedure (< 1 min.) worden de vissen bijgebracht in een doorstroomd bassin. De proef dieren worden hierbij continu geobserveerd. Naar verwachting komen de dieren na enkele minuten weer bij. Wanneer de vis goed in staat is te zwemmen en zijn normale gedrag weer vertoont, wordt deze vervolgens weer teruggezet op de vangstlocatie.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Omdat het gedrag van diverse is soorten onder wisselende omstandigheden bij de te onderzoeken vismigratievoorziening/belemmering wordt onderzocht, waarbij op voorhand de reacties niet precies te duiden zijn, is het niet mogelijk om voor een statistische aanpak te kiezen om het aantal proef dieren exact te bepalen. Bedacht moet worden dat er verlies aan proef dieren optreedt door predatie en de passage van gemalen. Deze factor is daarom niet constant. De intensiteit van de migratie is tevens wisselend, afhankelijk van externe omstandigheden als rivierafvoer, temperatuur, interne condities van elke vis etc. (o.a. rijpheidsstadium, migratiedrang, etc.). De aantallen in te zetten proef dieren bij elk te onderzoeken vismigratievoorziening/belemmering zijn 200 exemplaren. Deze aantallen zijn gebaseerd op reeds in het verleden met succes uitgevoerde gelijke onderzoeken, waarbij is gekeken naar het uiteindelijke aantal dieren/lengteklassen dat gedetecteerd werd, op basis waarvan conclusies konden worden getrokken ten aanzien van passeerbaarheid van de kunstwerken.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Bij elk onderzoek wordt gebruik gemaakt van maximaal 200 vissen (o.a. aal, winde, barbeel, blankvoorn, brasem, kolblei, baars, snoek) representatief voor de aanwezige visstand bij de het onderzoeken knelpunt. Deze soorten zijn niet voorhanden in de kweek en waar deze dat wel zijn betreft het dieren met onnatuurlijk gedrag. Zo is van kweekvis bekend dat deze zich oriënteren op de oppervlakte (daar wordt immers gevoerd), waardoor ze extra kwetsbaar zijn voor predatie en een ander zwemgedrag vertonen. Diverse lengteklassen worden gebruikt (> 15 cm, dit i.v.m. de grootte van de PIT tag in verhouding tot de afmeting van de vis.), zowel kleine als grote vissen dienen te kunnen migreren. De te onderzoeken vissen worden betrokken van ter zake kundige beroepsvisserij en/of gevangenen door ervaren medewerkers van ATKB (middels fuiken en/of zegenvisserij). De leeftijdsrange van de experimentele vissen zal lopen van 2 jaar oud (2+ groep) tot vissen van enkele jaren oud. Alleen op het oog gezonde vissen zullen worden gebruikt in het onderzoek. Voor één experiment is het gebruik van 200 vissen voldoende om genoeg detecties te krijgen teneinde het verloop van de migratie en het migratiesucces te kunnen duiden, zoals is gebleken uit eerder onderzoek.

Naar verwachting zal ATKB maximaal 5 van deze PIT tag onderzoeken per jaar gaan uitvoeren. Dat betekent dat per onderzoeksjaar maximaal 1000 uit het wild gevangen vissen zullen worden ingezet als proefdier. Over een periode van 5 jaar betreft dit dan maximaal 5.000 vissen. Herkomstcode=3. Met de onderzoeksgegevens kunnen waterbeheerder vervolgens aan de slag om mogelijke knelpunten op te heffen of te verbeteren. De gekozen diersoorten en levensstadia zijn, zoals eerder vermeld representatief voor de lokale visstand en de problemen die deze ondervindt tijdens de (paai)migratie.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging is geen optie; het betreft soortspecifieke informatie die uit het onderzoek verkregen wordt. Andere dan in de te onderzoeken wateren voorkomende vissoort nemen, leidt niet tot de gewenste resultaten. Doel is immers na te gaan of lokaal voorkomende soorten de vismigratievoorziening/belemmering succesvol weten te passeren. De gekozen aantallen zijn statistisch niet goed te onderbouwen, maar gebaseerd op ervaringen uit eerder onderzoek. Wil een beeld worden verkregen van de gehele stroomopwaartse en stroomafwaartse migratie langs vismigratievoorzieningen, dan zijn gekozen aantallen (200) per onderzoek noodzakelijk teneinde voldoende detecties te krijgen. Bij minder dieren komt niet in beeld in welke mate het knelpunt ook daadwerkelijk succesvol passeerbaar is, in beide richtingen, o.a. ten gevolge van tussentijdse uitval van proefdieren

(door predatie, vangst, sterfte door gemalen etc.).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Bij de vangst wordt gekozen voor een visvriendelijke vangstmethode; fuiken en zegens met knooploos want. Bij het scheppen van de vissen zal ook gebruik gemaakt worden van schepnetten met knooploos want. De vis wordt slechts kortdurend opgeslagen in een ruime, afgedekte en afgesloten vistank die continu wordt doorspoeld met water van de vangstlocatie. Hierdoor is de waterkwaliteit hetzelfde. Het implanteren van de PIT tags vindt plaats onder algehele verdoving. Er wordt zo steriel als mogelijk gewerkt (steriele PIT tags, steriele operatiematerialen, die per vis vernieuwd worden) om de kans op infecties te verkleinen. De aard van het experiment (waarbij de vis weer zo snel als mogelijk wordt teruggeplaatst in zijn habitat) maakt verdere pijnstilling niet mogelijk.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.
N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Er vindt per experiment slechts kortdurende opslag (1 tot max. 2 dagen) van de vissen plaats. Het oogmerk is om de dieren zo snel als mogelijk en verstandig terug te brengen in hun natuurlijke habitat. Op elke onderzoekslocatie zullen visbekkens (1.500 l elk) worden geïnstalleerd, waarbij de opgeslagen vissen middels een slangensysteem met dubbele pompen continu worden voorzien van vers water. Zodoende zijn de condities gelijk aan de condities in de wateren waar de vissen zijn gevangen. Voorts zijn de eisen gesteld in bijlage III deels niet passend voor kortdurende opslag van minder dan 1 of enkele dag.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Op de onderzoekslocaties betreft het vismigratieknelpunt dat onderzocht moet worden. Ter plaatse wordt een operatieopstelling ingericht met vistanks.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

De opslagduur zal zo kort mogelijk worden gehouden. Vissen worden bij voorkeur op dezelfde dag van de operatie nog losgelaten omdat zij dan in hun habitat de omgevingscondities kunnen selecteren waaronder de dieren zich het prettigst voelen. De visbekkens zijn afgesloten en niet voor buitenstaanders toegankelijk. Ook is er toezicht ter plaatse door de betrokken waterbeheerders en ervaren medewerkers van ATKB.

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdooving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Vissen zijn verdoofd tijdens het injecteren van de PIT tag. Daarna wordt geen pijnstilling meer toegepast; de vissen worden zo snel als mogelijk is, weer uitgezet in hun natuurlijke habitat.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle vissen worden voor elk individueel onderzoekgevangen door middel van fuiken en/of zegenvisserij. Op voorhand kan niet worden vastgesteld welke visserijmogelijkheid in het betreffende te onderzoeken water het meest geschikt zal zijn. Het is in elk geval zo dat voor alle twee visserijmogelijkheden een vergelijkbare hoeveelheid stress en lichte mate van ongerief kan optreden. Stress kan ook ontstaan bij de handeling van de vissen en bij de kortdurende opslag. De mate van ongerief voor voogenoemde handelingen is licht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Wilde vissen worden gevangen met fuiken en/of zegenvisserij, waarmee ze gedurende enige tijd in hun bewegingen en doen en laten worden beperkt.

Tijdens het experiment worden de vissen opgescheept met handschepnetten.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Vissen verblijven zo kort mogelijk in de fuiken / zegens (worden elke dag). De opslag is ook niet van langere duur (hooft 1 tot 2dagen). Er wordt gebruik gemaakt van knoopploos want in de netten, waarmee beschadiging van de vis wordt voorkomen. Opslag vindt plaats in afgesloten, donkere tanks (1500 l elk) die continu worden voorzien van vers water van de vangstlocatie, waarmee de omgevingscondities optimaal zijn.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder tijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De uitvoerders van de proeven hebben zeer ruime ervaring met visgezondheid, visgedrag. Bij twijfel over overleving zal er voor worden gekozen de vis te euthanaseren. Als gevolg van het inbrengen van PIT tags zou enige inwendige verwonding van de ingewanden kunnen optreden. Uit ervaring is gebleken dat deze verwondingen niet of nauwelijks optreden en slechts zelden leiden tot blijvend letsel of sterfte. Indien afwijkend (zwem)gedrag (gebrek aan oriëntatie, ongewone lichaamshouding, ongewone zwembewegingen, lethargie) na het merken optreedt als gevolg van inwendige verwonding, zal de vis, zoals eerder vermeldt, uit de proef worden gehaald en worden gedood. Indien sporadische of onvoorspelbare problemen met de vissen optreden, zal worden beoordeeld hoe de overlevingskans is na het in vrijheidstellen. Als deze goed wordt bevonden, worden de dieren in de proef gehouden. Als de overlevingskans aanzienlijk verminderd is, zal de vis worden onttrokken aan de proef. Als er daadwerkelijk aanleiding is om dieren uit de proef te nemen en te doden, worden deze geëuthanaseerd door ze in een basin te brengen met daarin een overdosering van benzocaine (200 mg/l) net zo lang totdat de dood is ingetreden.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Uit eerdere ervaringen kan worden geconcludeerd dat dit percentage aanzienlijk minder is dan 1%.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

.Alle hierboven beschreven negatieve effecten culminereren in een lichte mate van ongerief. Het inbrengen van een PIT tag veroorzaakt licht ongerief. Het totale cumulatieve ongerief geclassificeerd zich daarmee als licht. De ongeriefinschattingen hebben betrekking op 100% van de dieren in het experiment.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Alleen in het geval er twijfel is over de overleving na het inbrengen van de PIT tag. Dit heeft slechts betrekking op een zeer klein aantal vissen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

21200

ATKB

Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (Vistrappen, sifons, gemalen)

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Veel vissoorten worden in de Nederlandse wateren bedreigd door de aanwezigheid van migratiebarrières. Het betreft in polder- en boezemgebieden veelal ingewikkelde migratieknelpunten, omdat de natuurlijke migratierichting van vissen in de verschillende seizoenen tegen de stroomingsrichting van het water (uitgaande van het aanwezig verval) ingaat. Nederlandse waterschappen hebben zich daarom de afgelopen jaren veel moeite getroost om de belangrijkste vismigratieknelpunten tussen buitenwater, boezem en polder, maar ook op de rivieren, vispasseerbaar te maken middels de aanleg van, vaak complexe, vispassages. Vooralsof zijn deze vele oplossingen voor vismigratie wel aangelegd, maar nog niet onderzocht op hun daadwerkelijke functionaliteit. Werken de aangelegde constructies wel voor migrerende riviertrekvisen, en zo ja, in welke mate? Daarnaast is het belangrijk om de mate van passage bij migratiebelemmerende kunstwerken zoals duikers, sifons etc. vast te stellen. Een van de meest voor de hand liggende manieren om dit efficiënt en, en voor vissen op een zo diervriendelijke wijze, uit te voeren is onderzoek middels PIT telemetrie waarbij de onderzoeksvraag optimaal kan worden beantwoord. Het is van groot belang dat er regelmatig onderzoek wordt verricht omdat een goede vismigratie bijdraagt aan de kwaliteit van de visstand in het waterlichaam (vereist vanuit de Kaderrichtlijn Water) en daarmee aan de omgevingskwaliteit zelf.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Voor het instandhouden van de meeste vissoorten is het een noodzaak dat zij hun migratie op rivieren en kanalen en van boezem naar polder en vice versa zo natuurlijk mogelijk kunnen volbrengen. Tijdens hun migratie komen vissen vele kunstwerken en barrières tegen die vaak moeilijk of niet passeerbaar zijn. Voor de instandhouding van deze Nederlandse vissoorten is het derhalve van groot belang om onderzoek te verrichten waar exact de knelpunten in hun migratietochten in het voor- en najaar liggen. Door de vissen te voorzien van PIT tags kunnen deze worden gevolgd tijdens hun migratie. Knelpunten bij de migratie langs eerder genoemde kunstwerken komen in beeld door vertraging tijdens de paalmigratie, oponhoud bij vispassages, soortsgerelateerde problemen en overige invloeden. Ook het verlies van gemerkte dieren (visserij, predatie, schade door gemalen) komt met deze onderzoeksmethode goed in beeld en over een lange periode, de PIT tags gaan namelijk 'oneindig' mee. Als de knelpunten eenmaal zijn geïdentificeerd, kunnen passende maatregelen worden genomen om deze te verwijderen, danwel de impact ervan te verminderen. Waterbeheerder kunnen hierdoor op een efficiënte wijze hun maatregelenpakket voor de KRW uitvoeren.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Door het hier beschreven onderzoek wordt inzicht verkregen in het gedrag van diverse vissoorten tijdens hun paaimigratie (en vice versa) bij migratieknelpunten in door de mens veranderde riviersystemen en in polder-boezem systemen. Deze kennis is van groot belang, immers, voor zeer veel geld worden vele, vaak innovatieve, vispassages aangelegd, maar niet onderzocht op hun daadwerkelijke functioneren. De instandhouding van het natuurlijke gedrag van vissoorten draagt bij aan de kwaliteit van de waterlichamen in Nederland binnen de Kaderrichtlijn Water en is derhalve van groot belang voor mens en dier. Naast de zorg voor het instandhouden van beschermde vissoorten is het voortbestaan van veel vissoorten gebaat bij kundig en gedegen onderzoek naar het effect van migratieknelpunten en oplossingen. Door het onderzoek krijgt de waterbeheerder de mogelijkheid om aanpassingen door te voeren in beleid en constructies. Tevens kan op deze wijze op termijn de effectiviteit van getroffen maatregelen worden geëvalueerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Met behulp van PIT telemetrie kunnen vissen nauwkeurig worden gevolgd in hun gedrag op locaties waar zogenaamde antennes zijn geïnstalleerd. Vissen die middels een injectienaald voorzien zijn van een PIT tag worden bij elke passage van een PIT antenne station gedetecteerd. Omdat alle vissen een uniek merk hebben, kan de individuele vis worden gevolgd, waarbij telkens bij elke detectie informatie als datum, tijd en duur van verblijf wordt vastgelegd. Door een scala aan vissoorten te merken, van verschillende levensstrategieën, leeftijd/lengteklassen en verschillende aard van migratie, wordt een compleet beeld verkregen van de migratiemogelijkheden en de parameters die hierop van invloed zijn. Op deze wijze kan voor elk vismigratieknelpunt exact in kaart worden gebracht welke soort waar een probleem heeft om zijn natuurlijke migratiegedrag voort te zetten. PIT telemetrie is vooral geschikt voor kunstwerken met een relatief geringe omvang. De detectierange van de PIT tags is tamelijk beperkt.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Diverse soorten vissen (aal, winde, barbeel, blankvoorn, brasem, kolblei, baars, snoek, paling, etc.) worden gemerkt in het voorjaar (april, mei, juni) en in het najaar (augustus, september, oktober) wanneer ook de natuurlijke (paal)migratie van deze vissen plaatsvindt. Deze soorten zijn niet voorhanden in de kweek en waar deze dat wel zijn, betreft het dieren met onnatuurlijk gedrag. Zo is van kweekvis bekend dat deze zich oriënteren op de oppervlakte (immers, daar wordt gevoerd), waardoor ze extra kwetsbaar zijn voor predatie en een ander zwemgedrag vertonen. De vissen worden losgelaten aan de boven- of benedenstromse zijde van een vismigratieknelpunt, afhankelijk van het seizoen, zodat de migratie door de vispassage/knelpunt vervolgens middels een of meerdere detectie stations (PIT antennes) kan worden gevolgd. Afhankelijk van de opdrachtgever zal de exacte locatie waar deze proef zal plaatsvinden nader worden bepaald. Elke proef zal wel op dezelfde inhoudelijke wijze worden uitgevoerd. Per experiment zullen 200 vissen middels een injectienaald wordt voorzien van een PIT tag, om vervolgens na een korte rustperiode te worden uitgezet. Op basis van dit aantal, verdeeld over verschillende soorten en lengteklassen, worden voldoende detecties verwacht om conclusies te kunnen trekken die geldig zijn voor de hele visstand. Het type dierproef is voor elke vissoort hetzelfde. Implantatie van de PIT tag vindt plaats in de buikholte van de vis, waarbij de tag aan in de literatuur vastgestelde vereisten (qua grootte en gewicht) moet voldoen. In de literatuur is ook het operatieprotocol beschreven, waarmee alle uit te voeren handelingen en de te gebruiken materialen en wijze van (kortdurende) opslag van vis zijn vastgelegd.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het scala aan te gebruiken vissoorten is representatief voor de migratie ter plaatse. Daarnaast komt door de gekozen aanpak zowel de stroomopwaartse als de stroomafwaartse migratie in beeld, voor de relevante perioden waarin migratie van de soorten voor hun natuurlijke gedrag plaatsvindt. Deels is dit in het voorjaar, deels in het najaar. Het beheer van kunstwerken en migratieknelpunten vindt plaats al naar gelang de afvoeren door het jaar heen, waarmee de omstandigheden tijdens de migratie veranderen en de effecten op de migratie in beeld komen. Het voorzien van vissen van PIT tags zal plaatsvinden in het voorjaar (april, mei, juni) en in het najaar (augustus, september, oktober). De exact te gebruiken vissoorten hangen, zoals eerder vermeld, sterk af van het aanbod bij het te onderzoeken kunstwerk. Bedacht moet worden dat het onderzoek deels in concurrentie en per jaar wordt uitgezet door de

opdrachtgevers. Op voorhand kan dus ook niet worden geconcludeerd dat ATKB deze onderzoeken allemaal zal uitvoeren. Een en ander is mede afhankelijk van jaarlijks vast te stellen onderzoeksbudgetten bij voornoemde instanties en concurrentie overwegingen. De genoemde aantallen (200 per experiment, 5 experimenten per jaar (1.000 vissen), gedurende 5 jaar (in totaal 5.000 vissen) betreffen een maximum schatting.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer ATK0011
2. Titel van het project: Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC-Consult
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC 12-01-2015
 - aanvraag compleet 10-02-2015
 - in vergadering besproken 19-01-2015
 - anderszins behandeld: Na completering van de aanvraag vanaf 10-02-2015 is de behandeling verder door 6 DEC-leden schriftelijk afgehandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD:
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats

- Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
- Datum 21-01-2015
 - Strekking: completering van de aanvraag
 - Datum antwoord 23-01-2015/10-02-2015
 - Strekking van het (de) antwoord(en): aanvraag is gecomplementeerd.
 - De antwoorden hebben geleid tot completering van de aanvraag
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
 - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
 - wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Door middel van onderzoek naar de vismigratie door in waterlichamen aangelegde kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen) kan de bepaald worden of de nieuwe, naar verwachting visvriendelijke, kunstwerken daadwerkelijk de migratie van vissen faciliteren. Een goede vismigratie draagt bij aan de kwaliteit van de visstand in het waterlichaam en daarmee ook aan de omgevingskwaliteit. De DEC classificeert het belang van dit onderzoek daarom als reëel.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak leiden naar verwachting tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
5. Voor het onderzoek worden dieren uit wildvang gebruikt, afkomstig van de locaties waar de knelpunten voorkomen. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Het is essentieel dat de dieren in het experiment trekgedrag vertonen dat representatief is voor de dieren die voorkomen in de betreffende waterlichamen.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Bij de vissen wordt middels een naald een PIT tag ingebracht. Op grond van reeds aanwezige ervaring bij de aanvrager is het aannemelijk dat de dieren na een korte observatie- en herstelperiode geen hinder ondervinden van de aanwezigheid van de PIT tag. Het ongerief is naar het oordeel van de DEC te classificeren als hooguit licht gedurende maximaal 1 dag.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Het onderzoek betreft in alle gevallen altijd de betreffende diersoorten en hun migratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen) in waterlichamen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch in relatie tot de onderzoeksvraag. De aanvrager heeft een uitgebreide ervaring met dit soort onderzoek. Met de voorgestelde aantallen gewichtsklassen en dieren per kunstwerk kan een realistisch beeld worden verkregen van de lokale knelpunten bij vismigratie en van de effectiviteit van maatregelen om deze knelpunten op te heffen.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Omdat in dit onderzoek de afstand tot de meetstations hooguit decimeters of meters is, is er gekozen voor het gebruik van kleine injecteerbare PIT tags. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Veel vissoorten worden in hun biotoop in hun mobiliteit belemmerd door migratie barrières (zoals duikers, sifons, dammen, stuwen, sluizen, niet optimale vispassages). De dierproeven in dit project richten zich op de mobiliteit beperkende effecten van vaak nieuw aangelegde lokale specifieke 'kunstwerken' en dragen daarmee bij aan het creëren van optimale leefomstandigheden voor lokale populaties vissoorten waardoor deze zich kunnen handhaven en kunnen groeien. Dat belang rechtvaardigt het hier voorgestelde gebruik van een relatief beperkt aantal vissen die maximaal gedurende korte tijd licht ongerief zullen ondergaan. Een belangrijke ethische overweging hierbij is dat de resultaten van dit onderzoek ten goede komen aan de betreffende vissoorten. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is gezien de ervaring van de betreffende onderzoeksgroep waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
2015-2019

Vismigratie, vispassages, riviertrekkvis, Kader Richtlijn Water, migratiebarrieres

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project
(bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Nederlandse waterschappen hebben zich ingespannen om vismigratieknelpunten vispasseerbaar te maken. Veel vissoorten worden bedreigd door de aanwezigheid van migratiebarrières (zoals dammen, stuwen, sluizen). De migratiemogelijkheden dienen onderzocht te worden. Een manier om dit efficiënt en, en voor vissen op een zo diervriendelijke wijze, uit te voeren is onderzoek middels PIT (Passive Integrated Transponder) telemetrie. Hierdoor wordt gedetailleerd inzicht gekregen in het gedrag van de vis bij de barriere en kan aangegeven worden welke verbeteringen moeten worden aangebracht.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Het onderzoek maakt inzichtelijk welke mogelijkheden vissen hebben om kunstwerken te passeren en welke aanpassingen nodig zijn om de migratie te optimaliseren. Hierdoor kan het migratiesucces toenemen en zijn de soorten beter in staat de populatie in stand te houden. Een en ander komt ten goede aan de kwaliteit van het milieu (betere score voor de Kaderrichtlijn Water).
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Diverse vissoorten (aal, winde, barbeel, blankvoorn, brasem, kolblei, baars, etc.), te vangen door beroepsvisserij of door ervaren medewerkers van ATKB (maximaal 1000 vissen per jaar, 200 vissen per onderzoek, 5 onderzoeken per jaar) Over een periode van 5 jaar betreft dit maximaal 5.000 vissen.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- De vissen ondervinden ongerief als gevolg van het vangen en tijdens de kortdurende opslag (maximaal 1 etmaal) in visbekkens. De vis wordt tijdens de procedure onder verdoving gebracht. Als gevolg van het implanteren van een PIT tag in de vis ondervindt deze na de procedure hinder van de operatiewond, totdat deze is geneeld. Het bijkomen uit de verdoving resulteert tevens in ongerief.
- 3.5 Hoe worden de diertoevoeren in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Licht
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- De dieren worden na implantatie van de PIT tag in vrijheid gesteld op het moment dat zij hersteld zijn van de verdoving.

4 Drie V's

<p>4.1 Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>	<p>Het onderzoek moet inzicht opleveren in het gedrag van vissoorten tijdens de migratie langs kunstwerken. Omdat dit gedrag soortspecifiek is, dienen de betreffende natuurlijke vissoorten te worden gebruikt en zijn er geen proefdier vrije alternatieven voorhanden. Genoemde vissoorten worden niet gekweekt. Tevens zouden kweekdieren geen natuurlijk gedrag vertonen bij migratiebarrières.</p>
<p>4.2 Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>	<p>De gekozen aantallen zijn gebaseerd op ervaringen uit eerder uitgevoerd onderzoek. Verlies van proefdieren t.g.v. vangst door beroepe- en sportvisserij en door predatie moet worden ingecalculeerd. Jaarlijks is sprake van andere omstandigheden tijdens migratie (afvoer, temperatuur, etc.) als gevolg waarvan het migratiesucces variabel is. Een aantal van 200 dieren per te onderzoeken vispassage/gemaal/sifon levert voldoende inzicht op in het verloop van de migratie.</p>
<p>4.3 Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p>	<p>Om inzicht te krijgen in de migratiemogelijkheden wordt gebruik gemaakt van PIT telemetrie. Dit levert gedetailleerde informatie over het gedrag van de vis bij de migratiebarriere en heeft als voordeel dat slechts een beperkt aantal vissen nodig is, vergeleken met andere technieken (merk-terugvangst experimenten, fulkenmonitoring gedurende een lange periode) Er wordt binnen het onderzoek gebruik gemaakt van een breed scala aan vissoorten om zo de migratiemogelijkheden voor de hele visstand in beeld te brengen.</p> <p>Het vangen van de vissen vindt plaats met fuiken en zegens van knooploos want, waardoor de vissen niet beschadigd worden. Tijdens de (kortdurende) opslag van dieren worden de condities (vers water, goede temperatuur en zuurstofgehalte) optimaal gehouden. Het injecteren van de PIT tag vindt plaats volgens een beproefd en bewezen operatieprotocol. Na het merken worden de dieren zo snel mogelijk in hun natuurlijke omgeving teruggezet.</p>

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

--	--



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ATKB

Poppenbouwing 34
4191 NZ Geldermalsen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD21200201543

Bijlagen

Datum 20 maart 2015
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [REDACTED]

Op 25 februari 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)."

Welke informatie nog nodig

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

Projectvoorstel Dierproeven

- U schrijft onder 3.1 Algemene projectbeschrijving – Achtergrond: "Vooralnog zijn deze vele oplossingen voor vismigratie wel aangelegd, maar nog niet onderzocht op hun daadwerkelijke functionaliteit." Echter, in de bijlage "Beschrijving Dierproeven", geeft u bij vraag E. als antwoord "n.v.t.". En onderaan p. 2 van ditzelfde document schrijft u: "Deze aantallen zijn gebaseerd op reeds in het verleden met succes uitgevoerde gelijke onderzoeken,..."

Gelieve zowel bij de projectbeschrijving als bij de beschrijving van de dierproeven aan te geven hoe u heeft nageetrokken of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd in binnen- of buitenland.

- Onder 3.3 Belang schrijft u dat voor zeer veel geld vele, vaak innovatieve, vispassages worden aangelegd, die niet eerder onderzocht zijn op hun daadwerkelijke functioneren. Houdt dit in dat deze vispassages nooit getest zijn – ook niet in laboratoriumomstandigheden – voor dat ze aangelegd worden?

- Bij 3.4.1. staat dat met behulp van PIT-telemetrie elke individuele vis kan gevolgd worden. Kunt u onderbouwen waarom het in het kader van dit project noodzakelijk is om elke vis individueel te volgen? Indien dit niet noodzakelijk is, valt het dan te overwegen om niet-invasieve technieken te gebruiken om de doelstelling te bereiken? Onderbouw tevens voor elke proef waarom het gebruik

van alternatieve niet-invasieve technieken niet mogelijk is om de algemene en onderliggende doelstellingen van het project te behalen.

Datum

20 maart 2015

Onze referentie

AVD21200201543

- In 3.4.2. wordt beschreven dat verscheidene vissoorten worden gemerkt. Bij deze soorten zitten zowel predator- als prooivissen. Hoe kan u voorkomen dat een prooivis opgegeten wordt door een predatorvis en u aldus de predatorvis als de proefvis aanziet?

Beschrijving Dierproeven (Bijlage)

- Bij de beschrijving van de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters (2.A.) staat dat de bestaande vismigratievoorzieningen/belemmeringen geoptimaliseerd zullen kunnen worden op basis van de vergaarde informatie. Kunt u inzichtelijk maken hoe dit kan?
- Gelieve vraag E. Herhaling te beantwoorden en daarbij inzichtelijk te maken op welke wijze voorkomen wordt dat proeven onnodig worden herhaald.

Niet-technische Samenvatting

- 3.1, 3.2 en 4.3: Gelieve vaktaal te vermijden: telemetrie, kunstwerken, fuikenmonitoring, zegens van knooploos want.
- 3.3: We raden u aan de naam van uw firma (ATKB) niet te vermelden.
- 4.2: Het geformuleerde antwoord is geen beantwoording van de vraag.

Opsturen informatie

De CCD zou graag uw aanvraag tijdens haar eerstvolgende vergadering behandelen. De CCD zou de gevraagde informatie derhalve uiterlijk dinsdag 31 maart 2015 van u ontvangen. U kunt deze informatie aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurt, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen, nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	21200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	ATKB	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer 1	Type dierproef Onderzoek naar de vis migratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen).

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Op het juiste moment in de tijd (natuurlijke migratieperiode, voorjaar, najaar danwel gehele jaar) zullen vissen op locaties waar knelpunten voorkomen (sifons, duikers, gemalen, vismigratievoorzieningen in diverse uitvoeringen, de exacte locaties zijn vooralsnog niet direct voorhanden) worden voorzien van PIT tags. De vissoorten worden betrokken van ter zake Kundige beroepsvisser of worden gevangen door ervaren medewerkers van ATKB op de te onderzoeken locaties, stroomaf- en opwaarts van de voorziening/het knelpunt. Na vangst worden de vissen zo kort mogelijk (hooguit 1 tot 2 dagen) in opslag genomen in grote visbekkens (1.500 l elk). De bekken zijn voorzien van een slangen en pompenstelsel waarmee er continu vers stromend water van de vangstlocatie wordt aangevoerd, en waarmee de bekken worden doorspoeld. Na vangst van de geschikte vis soorten (grootte- en gewichtskennmerken zijn

hierbij doorslaggevend) zal een operatieploeg naar de merkllocatie vertrekken. Het gebruik van PIT tags bij vissen is vooral in Amerika veelvuldig toegepast. Uit buitenlandse literatuur blijkt dat het inbrengen van PIT tags niet of nauwelijks tot sterfte bij vissen leidt (>99% van de vissen blijft in leven). De vissen van gewenste lengte (per soort verschillend) worden verdoofd met een oplossing van benzocaine. Nadat de vissen verdoofd zijn wordt een PIT tag met een zogenaamde 'handheld injector' met 'lock needle' in de buikholte ingebracht. Voor elk te merken vis wordt een nieuwe 'lock needle' gebruikt. Hierbij wordt semisteriel gewerkt waarbij iedere PIT tag ontsmet wordt met alcohol. Er zal goed worden gelet op om geen vitale organen te raken tijdens het inbrengen van de PIT tag. Direct na de procedure worden de vissen bijgebracht in een doorstroomd bassin met water van de locaties waar de vissen zijn gevangen. Vervolgens worden de vissen na een herstelperiode van de verdoving (duur o.b.v. observatie van het gedrag van de vissen) weer uitgezet in het water van herkomst. Per vis worden soort, lengte, en de unieke code van de ingeplante PIT tag genoteerd. Afhankelijk van het aanbod wordt op een dag enkele vissen voorzien van een PIT tag, danwel de gehele experimentele groep vissen (max. 200 vissen) voor een onderzoek. Vervolgens zal de migratie van de vis starten. Op de tocht langs de te onderzoeken vismigratievoorzieningen/belemmeringen passeert de vis een of meerdere PIT detectiestations (gelegen beneden- en bovenstroms van de betreffende vismigratievoorziening/belemmering (vispassage, duiker, sifon, etc.). De identiteit van de vis wordt tijdens de detectie vastgesteld en het tijdstip en de datum van detectie worden vastgelegd. Na verloop van tijd wordt de voornoemde informatie verzameld en geanalyseerd. Met de informatie kan exact voor elke individueel gemerkte vis en voor elke vis soort apart worden nagegaan of de onderzochte vismigratievoorziening/belemmering ook werkelijk kan worden gepasseerd, en met welke mate van succes. Hoeveel van de gemerkte vissen weten de vismigratievoorziening/belemmering succesvol te passeren en kunnen na de paai wederom de vismigratievoorziening/belemmering in tegenovergestelde richting passeren? Ook kan per soort het mogelijke oponthoud bij de vismigratievoorziening/belemmering worden vastgesteld. Middels dit soort onderzoek ontstaat dus een goed beeld van de migratie van vis onder diverse omstandigheden. De vergaarde informatie kan de waterbeheerder, i.s.m. ecologische experts, helpen om bestaande vismigratievoorzieningen/belemmeringen te optimaliseren om zo vissen een 'vrije' doorgang te bieden tijdens hun migratie. Hiervoor kunnen de volgende voorbeelden worden geleverd. Een vissluis (zoals bijvoorbeeld toegepast bij de Hoogheemraadschappen de Stichtse Rijnlanden en Delfland) heeft gedurende een bepaalde tijd een lokkende werking, zodat vis de sluis kan inzwemmen, waarna deze hogerop geschut wordt. De duur van de lokkende werking kan gevarieerd worden waarbij dan met PIT telemetrie het gedrag van de vis in beeld komt. Zo kon worden vastgesteld wat de optimale lokduur was om het aantal passerende vissen te maximaliseren. Een ander voorbeeld uit de praktijk, in een vertical slot vispassage kunnen de verticale openingen voorzien worden van PIT tag antennes, vissen kunnen ongestoord hier doorheen zwemmen. De passage snelheid en mogelijkheden komen hierbij in beeld. Mocht blijken dat bepaalde vissoorten/lengteklassen de slots niet kunnen passeren (bijvoorbeeld omdat de stroomsnelheid te hoog is), kan worden besloten een aantal bekken toe te voegen, waarmee de stroomsnelheid wordt verlaagd en passage alsnog mogelijk is. Middels PIT telemetrie is het bijvoorbeeld ook mogelijk om de werking van een rustbekken in de vispassage te evalueren. Op aanvraag zijn er nog vele voorbeelden te geven waarbij het inzetten van PIT telemetrie het mogelijk maakt om migratievoorzieningen te optimaliseren of migratiebelemmeringen voor een groot deel weg te nemen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Elke individuele vis wordt in het stadium van chirurgisch verdoving gebracht door toepassing van een oplossing van benzocaine (100 mg/l). Nadat de vissen voldoende verdoofd zijn wordt een PIT tag ingebracht. Voor elk te merken vis wordt een nieuwe 'lock needle' gebruikt. Hierbij wordt semisteriel gewerkt waarbij iedere PIT tag ontsmet wordt met alcohol. Er zal goed worden gelet om geen vitale organen te raken tijdens de procedure. Direct na de procedure (< 1 min.) worden de vissen bijgebracht in een doorstroomd bassin. De proefdieren worden hierbij continu geobserveerd. Naar verwachting komen de dieren na enkele minuten weer bij. Wanneer de vis goed in staat is te zwemmen en zijn normale gedrag weer vertoont, wordt deze vervolgens weer terug gezet op de vangstlocatie.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Omdat het gedrag van diverse is soorten onder wisselende omstandigheden bij de te onderzoeken vismigratievoorziening/belemmering wordt onderzocht, waarbij op voorhand de reacties niet precies te duiden zijn, is het niet mogelijk om voor een statistische aanpak te kiezen om het aantal proefdieren exact te bepalen. Bedacht moet worden dat er verlies aan proefdieren optreedt door predatie en de passage van bijvoorbeeld naast de vismigratievoorziening gelegen gemalen. Deze factor is daarom niet constant. De intensiteit van de migratie is tevens wisselend, afhankelijk van externe omstandigheden als rivierafvoer, temperatuur, interne condities van elke vis etc. (o.a. rijpheidsstadium, migratiedrang, etc.). De aantallen in te zetten proefdieren bij elk te onderzoeken vismigratievoorziening/belemmering zal naar schatting 200 bedragen. Deze aantallen zijn gebaseerd op reeds in het verleden met succes uitgevoerde gelijke onderzoeken, waarbij is gekeken naar het uiteindelijke aantal dieren dat de vismigratievoorziening/belemmering ook succesvol wist te passeren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Bij elk onderzoek wordt gebruik gemaakt van maximaal 200 vissen (o.a. aal, winde, barbeel, blankvoorn, brasem, koolblei, baars, snoek, paling) representatief voor de aanwezige visstand bij de het onderzoeken knelpunt. Diverse lengteklassen worden hierbij gebruikt (> 15 cm, dit i.v.m. de grootte van de PIT tag in verhouding tot de afmeting van de vis.), zowel kleine als grote vissen dienen te kunnen migreren. De te onderzoeken vissen worden betrokken van ter zake kundige beroepsvissers en of gevangen door ervaren medewerkers van ATKB (middels fuiken, zegenvisserij en of electrovissersrij). De leeftijdsrang van de experimentele vissen zal lopen van 2 jaar oud (2+ groep) tot vissen van enkele jaren oud. Alleen op het oog gezonde vissen zullen worden gebruikt in het onderzoek.

Naar verwachting zal ATKB maximaal 5 van deze PIT tag onderzoeken per jaar gaan uitvoeren. Dat betekent dat per onderzoeksjaar maximaal 1000 uit het wild gevangen vissen zullen worden ingezet als proefdier. Over een periode van 5 jaar betreft dit dan maximaal 5.000 vissen. Herkomstcode=3. Met de onderzoeksgegevens kunnen waterbeheerder vervolgens aan de slag om mogelijke knelpunten op te heffen of te verbeteren. De gekozen diersoorten en levenstadia zijn, zoals eerder vermeld representatief voor de lokale visstand en de problemen die deze ondervinden tijdens de paalmigratie.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging is geen optie; het betreft soortgebonden informatie die uit het onderzoek verkregen wordt. Andere dan in de te onderzoeken wateren voorkomende vissoort nemen, leidt niet tot de gewenste resultaten. Doel is immers na te gaan of lokaal voorkomende soorten de

vismigratievoorziening/belemmering succesvol weten te passeren. De gekozen aantallen zijn statistisch niet goed te onderbouwen, maar gebaseerd op ervaringen uit eerder onderzoek. Wil een beeld worden verkregen van de gehele stroomopwaartse en stroomafwaartse migratie langs vismigratievoorzieningen, dan zijn gekozen aantallen (200) per onderzoek noodzakelijk. Bij minder dieren komt niet in beeld in welke mate het knelpunt ook daadwerkelijk succesvol passeerbaar is, in beide richtingen, o.a. ten gevolge van tussentijdse uitval van proefdieren (door predatie, vangst, passage van gemalen etc.).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Het implanteren van de PIT tags vindt plaats onder algehele verdoving. Er wordt zo steriel als mogelijk gewerkt (steriele PIT tags, steriele operatiematerialen, die per vis vernieuwd worden) om de kans op infecties te verkleinen. De aard van het experiment (waarbij de vis weer zo snel als mogelijk wordt teruggeplaatst in zijn habitat) maakt verdere pijnstilling niet mogelijk.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

- N.v.t. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek (zie het document Toelichtingop de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning).

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Er vindt per experiment slechts kortdurende opslag (1 tot max. 2 dagen) van de vissen plaats. Het oogmerk is om de dieren zo snel als mogelijk en verstandig terug te brengen in hun natuurlijke habitat. Op elke onderzoeklocatie zullen visbekkens (1.500 l elk) worden geïnstalleerd, waarbij de opgeslagen vissen middels een slangensysteem met dubbele pompen continu worden voorzien van vers water. Zodoende zijn de condities gelijk aan de condities in de wateren waar de vissen zijn gevangen. Voorts zijn de eisen gesteld in bijlage III deels niet passend voor kortdurende opslag van minder dan 1 dag.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Op de onderzoeklocaties betreft het visbekkens zoals hierboven beschreven.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?
De opslagduur zal zo kort mogelijk worden gehouden, afhankelijk van de conditie van de vissen. Vissen worden bij voorkeur op dezelfde dag van de operatie nog losgelaten omdat zij dan in hun habitat de omgevingscondities kunnen selecteren waaronder de dieren zich het prettigst voelen.

De visbekkens zijn afgesloten en niet voor buitenstaanders toegankelijk. Ook is er toezicht ter plaatse door de betrokken waterbeheerders en ervaren medewerkers van ATKB.

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Vissen zijn verdoofd tijdens het injecteren van de PIT tag. Daarna wordt geen pijnstilling meer toegepast; de vissen worden zo snel als mogelijk is, weer uitgezet in hun natuurlijke habitat.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle vissen worden voor elk individueel onderzoekgevangen door middel van fuiken, zegenvisserij en of electorvisserij. Op voorhand kan niet worden vastgesteld welke visserijmogelijkheid in het betreffende te onderzoeken water het meest geschikt zal zijn. Het is in elk geval zo dat voor alle drie de visserij mogelijkheden een vergelijkbare hoeveelheid stress en lichte mate van ongerief kan optreden. Stress kan ook ontstaan bij de handling van de vissen en kortdurend transport. Het zelfde geldt voor de kortdurende huisvesting. De mate van ongerief voor voogenoemde handelingen is licht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Wilde vissen worden gevangen met fuiken, zegenvisserij en of electrovisserij, waarmee ze gedurende enige tijd in hun bewegingen en doen en laten worden beperkt.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Vissen verblijven zo kort mogelijk in de fuiken / zegens (worden elke dag of om de dag gelicht). De opslag is ook niet van langere duur (hooguit 1 tot enkele dagen). Er wordt gebruik gemaakt van knooploos want in de netten, waarmee beschadiging van de vis wordt voorkomen. Opslag vindt plaats in afgesloten, donkere tanks (1500 l elk) die continu worden voorzien van vers water van de vangstlocatie, waarmee de omgevingscondities optimaal zijn.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De uitvoerders van de proeven hebben zeer ruime ervaring met visgezondheid, visgedrag. Bij twijfel over overleving zal er voor worden gekozen de vis te euthanaseren. Als gevolg van het inbrengen van PIT tags zou enige inwendige verwonding van de ingewanden kunnen optreden. Uit ervaring is gebleken dat deze verwondingen niet of nauwelijks optreden en slechts zelden leiden tot blijvend letsel of sterfte. Indien afwijkend (zwem)gedrag (gebrek aan oriëntatie, ongewone lichaamshouding, ongewone zwembewegingen, lethargie) na het merken optreedt als gevolg van inwendige verwonding, zal de vis, zoals eerder vermeldt, uit de proef worden gehaald en worden gedood. Indien sporadische of onvoorspelbare problemen met de vissen optreden, zal worden beoordeeld hoe de overlevingskans is na het in vrijheidstellen. Als deze goed wordt bevonden, worden de dieren in de proef gehouden. Als de overlevingskans aanzienlijk verminderd is, zal de vis worden onttrokken aan de proef. Als er daadwerkelijk aanleiding is om dieren uit de proef te nemen en te doden, worden deze geëuthanaseerd door ze in een bassin te brengen met daarin een overdosering van benzocaine (200 mg/l) net zo lang totdat de dood is ingetreden.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Uit eerdere ervaringen kan worden geconcludeerd dat dit percentage minder is dan 1%.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

.Alle hierboven beschreven negatieve effecten culminereren in een lichte mate van ongerief. Het inbrengen van een PIT tag veroorzaakt matig ongerief. Het totale cumulatieve ongerief geclassificeerd zich daarmee als matig. De ongeriefinschattingen hebben betrekking op 100% van de dieren in het experiment.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Alleen in het geval er twijfel is over de overleving na het inbrengen van de PIT tag. Dit heeft slechts betrekking op een zeer klein aantal vissen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

21200

ATKB

Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (Vistrappen, sifons, gemalen)

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translatieel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Veel vissoorten worden in de Nederlandse wateren bedreigd door de aanwezigheid van migratiebarrières. Nederlandse waterschappen hebben zich daarom de afgelopen jaren veel moeite getroost om de belangrijkste vismigratieknelpunten vispasseerbaar te maken middels de aanleg van, vaak complexe, vispassages (zoals 'de Wit vislift', vertical slot vispassages, vispassage via rinketten, aangepast sluisbeheer, vizel vispassages, etc.). Slechts een fractie van deze aangelegde oplossingen is in de praktijk ook onderzocht op werkzaamheid (zie het document "Nederland leeft met vismigratie"). Daarnaast zijn er ook nog veel kunstwerken waarvan men niet precies weet of deze een negatieve invloed op de migratie van vissen hebben. Denk hierbij aan sifons (diepeleggen donkere buizen onder bijvoorbeeld kanalen door) of aan onderlopende stuwten, sommige typen gemalen of scheepvaartsluizen. Zowel de werking van aangelegde vismigratievoorzieningen als de invloed van bestaande kunstwerken op de vismigratie moet worden onderzocht. Vismigratievoorzieningen zijn in hun werking vaak locatiespecifiek en door onderzoek ter plaatse moet blijken of deze ook aan de verwachtingen voldoen. Daarnaast, bepaalde kunstwerken kunnen in mindere mate dan gedacht een belemmerende invloed op vismigratie hebben. Mocht uit onderzoek blijken dat deze toch goed passeerbaar zijn, dan hoeft de waterbeheerder geen kostbare maatregelen te treffen. Een van de meest voor de hand liggende manieren om dit efficiënt en, en voor vissen op een zo diervriendelijke wijze, uit te voeren is onderzoek middels PIT telemetrie (chips die ook voor huisdieren worden gebruikt ter identificatie) waarbij de onderzoeksverraag optimaal kan worden beantwoord. Ten aanzien van andere technieken (zoals merk-terugvangst onderzoek of onderzoek waarbij fuiken achter een vismigratievoorziening worden geplaatst) heeft PIT tag onderzoek als voordeel dat slechts relatief weinig dieren hoeven te worden gebruikt (per individu worden vele detecties gekregen), het merk voor altijd werkzaam aanwezig blijft in de vis, dat de merkortaliteit nagenoeg nihil is (de merkprocedure is in de V.S. uitgebreid gedocumenteerd en onderzocht, zie: PIT Tag Marking Procedures Manual, Columbia Basin Fish and Wildlife Authority PIT Tag Steering Committee) en dat de methodiek niet arbeidsintensief en kostbaar is (als een detectiestation is ingericht, blijft dit data verzamelen zonder dat verdere arbeid nodig is). Het betreft toegepast onderzoek omdat in de praktijk genomen maatregelen geëvalueerd worden, waarbij verbeterpunten aan het licht komen. Daarnaast helpt het onderzoek de migratiemogelijkheden voor vis te optimaliseren zodat trekvissoorten hun populatie beter in stand kunnen houden. Voor obligate migranten, waaronder de aal, is het volbrengen van de migratie tussen zee en zoetwater (en vice versa) noodzakelijk om te kunnen bijdragen aan de voortplanting.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Voor het instandhouden van de meeste vissoorten is het een noodzaak dat zij hun migratie op rivieren en kanalen en van boezem naar polder en vice versa zo goed mogelijk kunnen volbrengen. Tijdens hun migratie komen vissen vele kunstwerken en barrières tegen die vaak moeilijk of niet passeerbaar zijn. Voor de instandhouding van deze Nederlandse vissoorten is het derhalve van groot belang om onderzoek te verrichten wat de ernst van deze knelpunten in hun

migratietochten is. Door de vissen te voorzien van PIT tags kunnen deze worden gevolgd tijdens hun migratie. Kneelpunten bij de migratie langs eerder genoemde kunstwerken komen in beeld door vertraging tijdens de paaimigratie, oponthoud bij vispassages, soortsgerelateerde problemen en overige invloeden. Ook het verlies van gemerkte dieren (visserij, predatie, passage door vispassages, sifons, sluisen etc.) komt met deze onderzoeksmethode goed in beeld en over een lange periode, de PIT tags gaan namelijk 'oneindig' mee. Als de kneelpunten eenmaal zijn geïdentificeerd, kunnen passende maatregelen worden genomen om deze te verwijderen, danwel de impact ervan te verminderen, door het aanleggen van bewezen vismigratievoorzieningen of bestaande te optimaliseren.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Door het hier beschreven onderzoek wordt inzicht verkregen in het gedrag van diverse vissoorten tijdens hun (paai)migratie (en vice versa) bij migratiekneelpunten in door de mens veranderde riviersystemen en in polder-boezem systemen. Deze kennis is van groot belang, immers, voor zeer veel geld worden vele, vaak innovatieve, vispassages aangelegd, maar niet onderzocht op hun daadwerkelijke functioneren (uit het document "Nederland leeft met vismigratie (2015)" blijkt dat in Nederland 1.131 vismigratievoorzieningen zijn gerealiseerd en dat hiervan 17% is onderzocht op hun werking. Veelal zijn de werkingsprincipes wel onderzocht, maar de aangelegde voorzieningen niet). De instandhouding van het natuurlijke gedrag van vissoorten draagt bij aan de kwaliteit van de waterlichamen in Nederland binnen de Kaderrichtlijn Water en is derhalve van groot belang voor mens en dier. Naast de zorg voor het instandhouden van beschermde vissoorten is het voortbestaan van veel vissoorten gebaat bij kundig en gedegen onderzoek naar het effect van migratiekneelpunten en oplossingen. Door het onderzoek krijgt de waterbeheerder de mogelijkheid om aanpassingen door te voeren in beleid en in de constructies. Tevens kan op deze wijze op termijn de effectiviteit van getroffen maatregelen worden geëvalueerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Met behulp van PIT telemetrie kunnen dieren (vissen, zoogdieren, vogels etc) nauwkeurig worden gevolgd in hun gedrag op locaties waar zogenaamde antennes zijn geïnstalleerd. Een PIT antenne is vergelijkbaar met een anti diefstal poortje bij een winkel, passeer je met een onbetaald product, dan gaat de zoemer. Op deze wijze kunnen antennes worden gebouwd, op maat, op cruciale migratiekneelpunten dan wel oplossingen. Vissen die middels een injectienaald voorzien zijn van een PIT tag worden bij elke passage van een PIT antenne station gedetecteerd. Omdat alle vissen een uniek merk hebben, kan de individuele vis worden gevolgd, waarbij telkens bij elke detectie informatie als datum, tijd en duur van verblijf wordt vastgelegd. Door een scala aan vissoorten te merken, van verschillende levensstrategieën, leeftijd/lengteklassen en verschillende aard van migratie, wordt een compleet beeld verkregen van de effecten die omgevingsomstandigheden (zowel van natuurlijke als van menselijke aard) gedurende het gehele jaar, de tags gaan immers oneindig mee, op de migratie van relevante soorten hebben. Op deze wijze kan voor elk vismigratiekneelpunt exact in kaart worden gebracht welke soort waar een probleem heeft om zijn natuurlijke migratiegedrag voort te zetten. Elke soort heeft zijn eigen migratiekarakteristieken en timing van migratie, zodat onder verschillende omstandigheden wordt gekeken naar het effect van kneelpunten/oplossingen bij de migratie. Over het jaar heen onstaat dan een compleet beeld, op basis waarvan beheersmaatregelen kunnen worden genomen. Identificatie op het niveau van het individu heeft de volgende voordelen: individuele kenmerken zoals soort, lengte, gewicht, geslacht, oogdiameter en borstvinlengte (bij schieraal) kunnen worden gekoppeld aan individueel gedrag bij migratiebarrières of vismigratievoorzieningen. Hiermee kan een bepaald gedrag worden verklaard, waarmee een beter inzicht ontstaat in waarom een migratiebarrière een blemmering is, of waarom een vispassage mogelijk niet goed functioneert. Bijvoorbeeld het kenmerk lengte van een vis. De lengte van een vis is o.m. bepalend voor de zwemcapaciteit. Door zowel grote als kleine vissen te merken, wordt bijvoorbeeld inzichtelijk dat de kleine lengteklasse niet (of wel) in staat is om de barrière te overwinnen. Zouden conventionele technieken (zoals fulken) worden gebruikt, dan ontbreekt deze lengteklasse in de vangst, maar tevens is niet bekend of de vis wel aanwezig is en een poging heeft gedaan (of gemotiveerd is) om te passeren. Door individuele detecties

van kleine dieren benedenstroms maar niet bovenstroms een barriere of vismigratievoorziening te zien, is bekend dat de vis een poging heeft gedaan te passeren maar dat het niet is gelukt. Ook kunnen PIT tag antennes en detectiestations ingezet worden op plaatsen waar conventionele technieken (zoals fuiken) niet toegepast kunnen worden. Op een locatie waar de stroming groot is en er veel debris wordt meegevoerd, kan geen fuik geplaatst worden omdat deze anders beschadigd zou raken/wegstromen. Een compacte PIT tag antenne kan met weinig moeite op elke plek geplaatst worden. Daarom is het berekenen van de doelstellingen niet mogelijk zonder PIT tags toe te passen. De keuze voor de toepassing van PIT tags is dus afhankelijk van de situatie/locatie. Voor elk experiment zal een afweging worden gemaakt of de toepassing van PIT tags noodzakelijk is, of dat andere, niet invasieve technieken kunnen worden ingezet.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Diverse soorten vissen (aal, winde, barbeel, blankvoorn, brasem, kolblei, baars, snoek, paling, afhankelijk van de locatie) worden gemerkt in het voorjaar (april, mei, juni) en in het najaar (augustus, september, oktober) wanneer ook de natuurlijke (paai)migratie van deze vissen plaatsvindt. De genoemde doelsoorten zijn slechts voorbeelden, het daadwerkelijke aanbod van Nederlandse vissoorten zal bij elk project uiteraard afhangen van de lokale vangsten. De vissen worden losgelaten aan de boven- of benedenstromse zijde van een vismigratiekneelpunt, afhankelijk van het seizoen, zodat de migratie door de vispassage/kneelpunt vervolgens middels een of meerdere detectie stations (PIT antennes) kan worden gevolgd. Afankelijk van de opdrachtgever zal de exacte locatie waar deze proef zal plaatsvinden nader worden bepaald. Elke proef zal wel op dezelfde inhoudelijke wijze worden uitgevoerd. D.w.z. dat een bepaald aantal vissen (ca. 200) middels een injectienaald wordt voorzien van een PIT tag, om vervolgens na een korte rustperiode te worden uitgezet in het water waar de vis ook daadwerkelijk is gevangen. Het is op voorhand niet te bepalen welke vismigratiekneelpunten zullen worden onderzocht, maar zoals eerder vermeld zal elke dierproef in deze gelijk zijn. Het type dierproef is voor elke soort hetzelfde. Het inbrengen van de PIT tag vindt plaats in de buikholte van de vis, waarbij de tag aan in de literatuur vastgestelde vereisten (qua grootte en gewicht) moet voldoen. In de literatuur is ook het operatieprotocol beschreven, waarmee alle uit te voeren handelingen en de te gebruiken materialen en wijze van (kortdurende) opslag van vis zijn vastgelegd. In theorie is het mogelijk dat één van de vissen in het onderzoek geprepareerd wordt door een roofvis. In de praktijk is dit ook beschreven. Door juist ook aanwezige roofvissen te voorzien van een PIT tag, ontstaat (voor deze combinatie van PIT tags) exact gelijktijdige detecties. Dan is duidelijk dat de proovivis met een PIT tag is geprepareerd door een roofvis met een PIT tag. Als een roofvis zonder PIT tag een vis met een PIT tag predeert, dan blijkt dat veelal door afwijkend gedrag. Trekvissen passeren een barriere; ze worden bijvoorbeeld benedenstroms gedetecteerd en dan bovenstroms en vervolgens niet meer (ze migreren verder naar de paaijgronden). Roofvissen blijven veelal op een bepaalde locatie (bijvoorbeeld vlak onder een stuw) aanwezig en jagen van daaruit op proovissen. Echter, een verwisseling van vissen is niet 100% uit te sluiten, maar het is onwaarschijnlijk dat dit zoveel optreedt dat er verkeerde conclusies worden getrokken.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het scala aan te gebruiken vissoorten is representatief voor de migratie ter plaatse. Daarnaast komt door de gekozen aanpak zowel de stroomopwaartse als de stroomafwaartse migratie in beeld, voor de relevante perioden waarin migratie van de soorten voor hun natuurlijke gedrag plaatsvindt. Deels is dit in het voorjaar (paaimigratie van boezem naar polder of stroomopwaarts), deels in het najaar (terug migratie van polder naar boezem of stroomafwaarts) en eveneens gedurende het hele jaar. Het beheer van kunstwerken en migratiekneelpunten vindt plaats al naar gelang de afvoeren door het jaar heen, waarmee de omstandigheden tijdens de migratie veranderen en de effecten op de migratie in beeld komen. Het voorzien van vissen van PIT tags zal plaatsvinden in het voorjaar (april, mei, juni) en in het najaar (augustus, september, oktober). De exact te gebruiken vissoorten hangen, zoals eerder vermeld, sterk af van het aanbod bij het te onderzoeken kunstwerk en dus van de locatie. Bedacht moet worden dat het onderzoek deels in concurrentie en per jaar wordt uitgezet door de opdrachtgevers. Op voorhand kan dus ook niet worden geconcludeerd dat ATKB deze onderzoeken allemaal zal uitvoeren. Een en ander is mede afhankelijk van jaarlijks vast te stellen onderzoeksbudgetten bij voornoemde instanties en concurrentie overwegingen. De genoemde aantallen betreffen een maximum schatting.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ATKB

Poppenbouwing 34
4191 NZ Geldermalsen
Nederland

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD21200201543

Datum 20 april 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 25 februari 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)" met aanvraagnummer AVD21200201543. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 30 maart 2015 heeft u uw aanvraag gewijzigd in antwoord op een aantal vragen en opmerkingen die wij hadden.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)" starten. De vergunning wordt onder voorwaarden afgegeven van 20 april 2015 tot en met 10 maart 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-Consult gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, behalve voor wat de ongeriefinschatting betreft: die schalen we in als zijnde matig. Daarenboven acht de CCD het van belang dat duplicatie wordt vermeden. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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 gegevens in de hoofding van deze brief.

Datum
20 april 2015

Onze referentie
AVD21200201543

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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. Ger de Peuffer
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- Projectvoorstel
 - Niet-technische samenvatting
 - DEC-advies

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: ATKB
Adres: Poppenbouwing 34
Postcode en woonplaats: 4191 NZ Geldermalsen
Deelnemersnummer: AVD21200

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 april 2015 tot en met 10 maart 2020 voor het project "Onderzoek naar de vismigratie door kunstwerken (vistrappen, sifons, gemalen)" met aanvraagnummer AVD21200201543, **volgens advies van DEC-Consult.**

De verantwoordelijk onderzoeker is projectleider.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 februari 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij brief op 30 maart 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij brief op 30 maart 2015.
 - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 februari 2015 ontvangen op 30 maart 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarde
Onderzoek naar de vismigratie door vismigratievoorzieningen (vistrappen, sifons, gemalen)	Diverse soorten vissen	Max. 5000 vissen	Matig	De aanvrager onderzoekt bij elke aanvraag voor het testen van een nieuw kunstwerk samen met de IvD of de passeerbaarheid van dit (type) kunstwerk al niet eerder is getest.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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 blijvende 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 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 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 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.

Locatie

De dierproeven worden (niet allemaal) verricht in een inrichting van een gebruiker volgens artikel 10g van de wet.

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.



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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10400	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Wageningen Universiteit
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	9 2 1 5 8 4 6
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700AW Wageningen
		IBAN	NL10RABO0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Universitair Docent
		Afdeling	Departement Diewetenschappen
		Telefoonnummer	0 3 1 [REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]@wur.nl
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nee |

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 |
| <input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 |

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 5 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 3 1 _ 1 2 _ 2 0 1 7 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| Bioflocs, the key to feed fish more with less |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|---|
| Meer met minder / Bioflocs, the key to feed fish more with less |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------------------------------|
| Naam DEC | DEC-WU |
| Postadres | Postbus 9101, 6700HB Wageningen |
| E-mailadres | ██████████@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige Incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ~~Melding technisch~~ Appendix Description animal procedures
- DEC-advies Bioflocs
- Bestelorder WUR839094 Bioflocs

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:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[Redacted]
Functie	gemadateerd vergunninghouder
Plaats	Wageningen
Datum	09 - 03 - 2015
Handtekening	[Redacted]



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 our website (www.zbo-ccd.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'.

10400

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

Wageningen UR

1.3 Provide the title of the project.

Bioflocs, the key to feed fish more with less approved NWO project; 847.13.007 - <http://www.nwo.nl/en/research-and-results/research-projects/10/2300179610.html>

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

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.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

The project is a collaboration between the Laboratory of Microbiology (MIB) and the Aquaculture and Fisheries (AFI) group of Wageningen UR and focusses on bioflocs, gut microbiota and gut functioning in fish.

Bioflocs are highly porous, amorphous aggregations of microorganisms, organic wastes and other constituents held together by extracellular polymeric substances. Bioflocs have been used extensively in the treatment of domestic- and industrial wastewater. The use of bioflocs as internal water purification units in aquaculture is a relatively new approach and is referred to as Biofloc Technology (BFT). In BFT the bioflocs are co-cultured together with the cultured species while the microorganisms in the bioflocs convert organic and inorganic wastes into bacterial biomass. The latter allows a production intensity which is 5 to 10 times higher than in traditional farming systems.

During protein metabolism of fish and shrimp about 25% of the nitrogen present in protein is retained in the biomass of the cultured species. The remainder is lost as uneaten feed, faeces and urinary and branchial loss. Ammonia, which is a main metabolite in protein digestion, is toxic for both fish and crustaceans. This makes ammonia removal critical in maintaining a favourable water quality. BFT relies mainly on heterotrophs, which directly assimilate ammonia into microbial biomass. Direct assimilation of ammonia has an advantage over the autotrophic conversion of ammonia which is a common practice in intensive aquaculture, since no toxic metabolic intermediates and products are formed (e.g. nitrite and nitrate production during nitrification). The production of these toxic compounds makes water replacements of the culture system essential, while with BFT these compounds are stripped from the water column, reducing the need for water replacements to (nearly) nil. When managed correctly much biomass is produced in BFT systems. This is an advantage because the uptake of bioflocs from the water by the cultured species leads to an increase in nutrient retention efficiencies of 10 to 20 %. The nutrient composition of bioflocs is very much suitable to serve as a feed source, it has been shown in multiple studies that both tilapia and shrimp have a better health status and show better growth in an environment with a high concentration of naturally occurring microorganisms (see section 3.3). The exact mechanisms involved leading to the positive effect of bioflocs on the growth, health and homeostasis in aquaculture species are not yet fully understood.

The current project will assess the effect of bioflocs in a bottom-up manner, first the mode of administering the bioflocs will be assessed resulting in a follow-up experiment in which the response to different concentrations of bioflocs in the feed will be examined. Then the active components inside the bioflocs will be evaluated to comprehend which constituents perform which function inside the gut and finally the pro- and prebiotic function of bioflocs and its components will be investigated. The latter will be investigated to evaluate possible effects of bioflocs on soya-induced enteritis (inflammation of intestine) in carnivorous fish, which is triggered by elevated levels of soya protein in the feed. Future expectations are that with development of the biobased economy in fish feeds fishmeal and fish oil will be gradually replaced by plant ingredients, some of them causing gut inflammation. The bioflocs which will be applied in

the above mentioned experiments will be produced under standardized conditions ensuring a stable source. The nutritional value of these bioflocs, which is roughly similar to fish feed on a dry matter basis, and the overall average microbial functionality are expected to remain stable throughout the experiments.

An overarching objective of the project is to assess what role the microbes, derived from bioflocs, play inside the gastrointestinal tract of fish. A better understanding of these mechanisms will aid in the broader implementation of bioflocs as a feed component outside the current mode of application. The project will improve protein utilization and lead to better fish performance. In addition, more waste conversion into bioflocs means less nutrient discharge from aquaculture which will benefit the environment. These possible positive impacts can prove to be of great importance seen the recent re-adjustment in the expected world population (1.1 billion people by 2100), as estimated by the United Nations. Furthermore, the results of this project will improve understanding of the role microbiota play in the homeostasis and health status of fish. Project concepts might be translatable to other vertebrates, including humans.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main goal of this project is to generate knowledge and create a deeper perception on the contribution of bioflocs to gut microbiota, gut functioning and homeostasis in fish.

Due to the applicability of bioflocs (defined under 3.1) in the aquaculture sector and the recent insights on the importance of gut microbiota in vertebrates the scope of this project has a nutritional and microbial-ecological direction. This scope will enable us to fill in the knowledge gaps which have been identified prior to the start of this project. The identified knowledge gaps are:

- (1) Is there a difference in the effect between live or dead bioflocs on gut homeostasis in fish;
- (2) Which concentration of bioflocs exerts the maximum effect on gut homeostasis in fish;
- (3) Can we identify 'active principles', explaining the effect of bioflocs on gut homeostasis for example polyhydroxybutyrate (PHB) concentration (substance used in microbial energy storage);
- (4) Which are the principle drivers affecting the microbial species composition in bioflocs under constant and uniform aquaculture like conditions;
- (5) It remains challenging to increase inclusion levels of vegetarian ingredients in aquaculture feed whilst reducing the fishmeal content due to physical reactions on those vegetarian product by, especially carnivorous, fish. Could bioflocs or components in bioflocs exert a countering effect on the physical adverse reactions to diets with high levels of vegetable ingredients.

During the project the following hypotheses will be tested

- Feeding live or dead bioflocs influences the microbial community composition in the gut but not functional stability.
- Fish performance (growth, feed conversion ratio (FCR), nutrient efficiency, survival) and gut homeostasis are positively affected by bioflocs concentration in the diet.
- PHB concentration in bioflocs has a significant effect on gut homeostasis.
- Inclusion of bioflocs in the diet reduces soya-induced enteritis in both herbivorous and carnivorous species

The project is exploratory and observes bioflocs, gut microbiota and gut functioning (digestion, growth, chyme content, enzyme activity in gut cells, etc.) under different treatments relevant to commercial fish husbandry. All analytical techniques are commonly used within the project team, but were never combined previously. The team will integrate the obtained data and generate new insights, advancing existing understanding of fish performance in biofloc systems. In this sense, the research feasibility is guaranteed.

3.3 Relevance

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

Bioflocs and biofloc technology can meet in the demand and need for less polluting and more productive food production. In addition it can contribute to food safety and security due to several aspects:

- Marine life evolved in presence of 'marine snow' (white organic aggregates of alive and dead organic substances), and numerous organisms will readily consume bioflocs which are similar in appearance (although not necessarily in texture).
- Agricultural and aquacultural waste streams which are converted into bioflocs become a valuable, protein-rich food source for aquatic organisms.
 - o in situ processing of metabolic wastes from fish production improves nutrient efficiency 10 to 20%, even when using lower grade and cheaper food ingredients.
 - o numerous types of organic agricultural wastes available in bulk quantities can be converted in bioflocs, turning a waste into a food ingredient.
- Bioflocs make aquatic organisms healthier:
 - o numerous experiments with bioflocs or biofilms documented better growth, survival, disease resistance and feed utilization, both for fishes and crustaceans.
 - o animals receiving bioflocs show higher resistance to pathogens in disease challenge tests.
 - o inclusion of bacterial biomass in diets of salmon and trout reduced soya-induced enteritis allowing higher inclusion levels of soya in exchange for fish meal without negative health effects. In this sense, biofloc technology can contribute to the improvement of fish meal use efficiency in aquaculture.
- Bioflocs purify water, reducing pollution and improving water use efficiency. This leads to better water quality and allows raising production intensity, heading towards sustainable zero-emission aquaculture production strategies.

The project focuses on analysing shifts in microbial community structure (species composition) and function of microbiota in the gut of fishes exposed or not exposed to live or processed bioflocs. Special attention is given to the production and role of polyhydroxybutyrate in bioflocs on gut functioning. This will yield information on how bioflocs influence microbial ecology and functional stability, and as such influence homeostasis.

The project includes training of one PhD and 4-6 MSc students. Project results will be shared at international conferences and project meetings, will be published in peer reviewed journals and integrated in the teaching of AFI and MIB. International exposure will strengthen the international reputation of The Netherlands as knowledge centre for green and sustainable aquaculture.

Knowledge generated through the project will allow the consortium together with Dutch aqua-feed producers to develop the concept of 'feeding the system' reducing overall feeding costs while improving nutrient use efficiencies and minimizing pollution.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Four experiments will be carried out. With the exception of experiment 4, the results of each experiment will affect the set-up of the next experiment. Each experiment addresses one hypothesis;

[Experiment 1:] Feeding live or dead bioflocs influences the microbial community composition in the gut but not functional stability.

The outcome of experiment 1 will result in the decision to use either live or dead bioflocs in experiment 2.

[Experiment 2:] Fish performance (growth, feed conversion ratio, nutrient efficiency, survival) and gut homeostasis are positively influenced by bioflocs concentration in the diet.

The outcome of experiment 1 and 2 will constitute the basis for diet composition and biofloc concentrations in diets used in experiment 3.

[Experiment 3:] PHB concentration in bioflocs has a significant effect on gut homeostasis.

The outcome of experiment 1-3 will result in diet preparation methods, concentrations of inclusion of bioflocs in diet of experiment 4.

[Experiment 4:] Inclusion of bioflocs in the diet reduces soya-induced enteritis in both herbivorous and carnivorous species.

The following scheme depicts a rough timeline of the different experiments carried out during the project.

Year	Month	2015	2016	2017
Experiment 1		P P X X L L L L L L D D D D	W W W W W W S	
Experiment 2		P X X L L L	L L L D D D W W W S	
Experiment 3			P X X L L L L L D D D D W	W W S
Experiment 4			P X X	L L L D D D W W W S

X: execution of activity

P: preparation of detailed thesis proposal or experiment

L: laboratory

D: data analysis; ecological modelling

W: manuscript writing

S: article/thesis submission

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

[Experiment 1:]

Live versus dead bioflocs

Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) will be grown from 1 to 10 g (approximately 30 days duration). Four diets (with known composition) will be tested:

- A: control (based on standard tilapia diet formulation)
- B: 10% live bioflocs from water + 90 % control feed (only treatment with bioflocs in the water)
- C: 10% dried biofloc in feed + 90 % control feed (included in pellet)
- D: 10% dried dead bioflocs in feed + 90 % control feed (included in pellet)

The treatments will be executed in triplicate with aquarium as experimental unit. The animals will be housed in 60 liter aquaria, connected to a recirculating aquaculture system. At the start of the experiment a total of 30 fish will be stocked per aquarium. Prior to the onset of the experiment 60 fish taken from the base population will be sampled to determine their proximate composition and gut microbiota composition. Sixty fish (1-1.5 g individual weight) is sufficient biomass to determine the proximate body composition, except for fat content. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. These fish will be euthanized using the anaesthetic TMS of which an overdose will be administered after unconsciousness sets in. Each of the sampled fish will be subsequently disinfected, the gut will be removed aseptically, gut resident microbiota will be collected for Illumina MiSeq (to perform microbial community species identification) and gut cell scrapings will be collected for mRNA analysis (to analyse gene expression). The remainder of the fish on day 30 will be euthanized and culled for proximate analysis. Handling of the fish will be avoided as much as possible. When handling is unavoidable (e.g. weighing at start of the experiment) the fish will be anaesthetized to minimize discomfort.

The fish are initially stocked with a total of 30 fish per tank: 5 fish will be sampled on day 15, 5 fish on day 30. Of the fish remaining at the end of the experiment the proximate composition will be determined. Thirty fishes in a 60-l aquarium is an adequate group size because at this density fish display natural feeding behaviour and consume feed in group, resulting in a good feed intake. During the experiment, the biomass will increase. By sampling and removing fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed.

During the experiment, a group of fishes equaling in number twenty percent of the number of animals initially stocked will serve as 'back-up' animals. These back-up fishes will be housed separately per treatment at the same density as fishes in the experiment. The 18 back-up fish per treatment (6 per experimental unit) will receive the same diets and housed under the same conditions as the experimental animals. The intention is to maintain the back-up fish at a similar average weight as the fish in the experiment. If mortality occurs during the experiment, back-up fish will be relocated to the relevant experimental unit. Replicates with a mortality higher than 20 % will be stopped. Back-up fish which are not used during the experiment will be culled at the end of the experiment.

(* the fish:water volume ratio is the same for 30 fish in 60 l and 18 fish in 36 l. On day 15 of the experiment 5 fish per aquarium will be removed. No fish will be removed from the back-up aquarium. In stead, the water volume will be increased by 16.7% (= 6 l) to maintain the same fish:water volume ratio as in the experimental aquaria. In case back-up fish need to be transferred to the experimental aquaria, then the water volume in the back-up aquarium will be adjusted to maintain the ratio similar as in the experimental aquaria).

Total number of fish used in this experiment sums up to: 60 + 360 = 420 + (Back-up fish: 20 % of 360 = 72) = 492 fish

Samples taken will include:

- Sampling of 60 fish taken from the base population to determine their proximate composition and gut microbiota composition.
- Samples of microbial communities in bioflocs, feed, culture water and gut (mucus & feces; 5 individuals per sampling day) will be taken on day 15 and day 30. Samples will be used to monitor microbial community composition and enzyme production by next generation sequencing of 16S rRNA gene fragments and the metatranscriptome (total mRNA).
- Daily monitoring of water quality in inlet water to fish tanks (temp., pH, total ammonia nitrogen (TAN), NO₂, NO₃, CO₂, conductivity).
- Histology: gut samples taken at start and end experiment
- Short chain fatty acids (SCFA's): gut and biofloc (fresh & processed) samples start and end
- Remaining fishes will be culled at the end of the experiment and used for proximate analysis. Fish will grow to 8-10 g individual weight at the end of the experiment. A total biomass of 160-200 g is just sufficient to perform a complete proximate analysis.

The choice to sample 5 fish per sampling point per experimental unit was made for statistical reasons, because from previous experiments performed by Giatsis et al. (2014)** we know that 5 fish per sampling provides sufficient statistical power with the proposed statistical- (e.g. PERMANOVA) and bioinformatical methods. Using 3 fish per sampling point (6 possible unique permutations) results in a minimum statistical probability of >10%. When using 4 fish per sampling point (24 unique permutations) the minimum statistical probability is 4.2 %. The minimum probabilities with both 3 and 4 fish per sampling point is too high, while using 5 fish per sampling point (120 unique permutations) results in a maximum probability < 1 % which is adequate.

The tilapia used in treatment B are held in water containing bioflocs. By nature, tilapia are capable of filter feeding and can withstand high concentrations of suspended solids in the water. The animal procedures which will be performed on the fish do not exert negative effects on fish comfort. All treatments will impose mild discomfort.

[Experiment 2:]

Dose response experiment of biofloc concentration in diet on gut homeostasis.

Whether live or dead bioflocs will be used depends on the outcome of experiment 1. Four different biofloc concentrations in the diet will be tested. The concentrations tested will also be decided based on the outcome of experiment 1. Group sizes and sampling protocols will be the same as for experiment 1. All treatments will impose mild discomfort.

[Experiment 3:]

"Active principle"

Two modes of action will be explored:

- Polyhydroxybutyrate: comparing effect of pure grade and biofloc-based PHB at different concentrations.
- Preparation-administration method of bioflocs. Depending on outcome of experiment 1 the methods are:
 - o live bioflocs: filter from water, paste (with binder).
 - o dead biofloc: dried, freeze dried and γ -radiated.

Group sizes and sampling procedures will be same as with experiment 1. Sampling will focus on microbial composition, enzyme production and SCFA's. All treatments will impose mild discomfort.

[Experiment 4:]

Reducing soya-induced enteritis through bioflocs

The composition of test diets will be based on experiences gained in the previous experiments. Besides tilapia, rainbow trout (carnivorous fish) will be

tested. Group sizes per replicate and sampling procedures will be the same as for experiment 1. It is to be expected that the animals used in the control group of experiment 4 will develop enteritis due to elevated levels of soya in the diet, the level of discomfort is estimated to be moderate. The latter is unavoidable due to the need of a positive control to test the beneficial nature of bioflocs on soya-induced enteritis. The discomfort imposed on the fish of the other treatments is estimated to be mild.

The total number of animals used during the project sums up to:

Nile tilapia:
 Experiment 1: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish
 Experiment 2: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish
 Experiment 3: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish
 Experiment 4: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish +

 1680 fish
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish +

 288 fish

Rainbow trout:
 Experiment 4: 60 fish for initial state + 4 * 3 * 30 = 360 fish = 420 fish
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Total use of experimental animals during project: 2100 fish
 Total use of experimental animals during project: 360 fish +

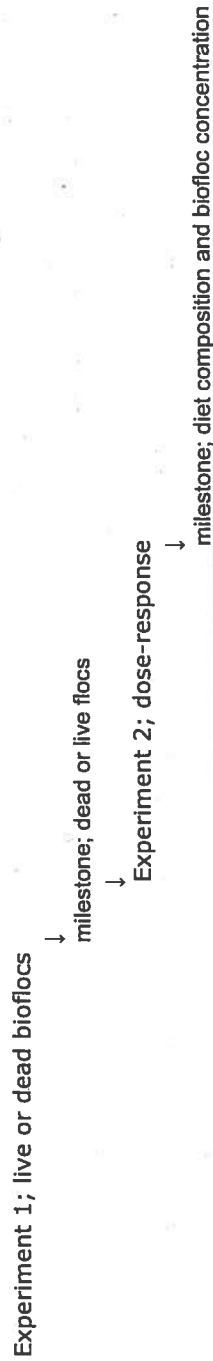
 2460 fish

At the start of each experiment 60 fish of the base population of Nile tilapia or rainbow trout will be sampled for proximate analysis. In total 240 Nile Tilapia and 60 rainbow trout will be used.

** Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Verreth, J., Verdegem, M., 2014. The Colonization Dynamics of the Gut Microbiota in Tilapia Larvae. PloS one. 9, e103641.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

As described in section 3.4.1 and 3.4.2 the experiments 2, 3 and 4 are all follow-up experiments. Every outcome of an experiment will be a milestone and decision point for the experimental design of its successor.



↓ Experiment 3; 'active principle'

↓ milestone; preparation methods, concentrations, duration

↓ Experiment 4; Reducing soya-induced enteritis

3.4.4 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	Response to nutrition and feeding experiment
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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, see our website (www.zbo-ccd.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'.

10400

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

Wageningen UR

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

1

Type of animal procedure

Response to nutrition and feeding experiment

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

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.

Each experiment has a total duration of 30 days.

In each experiment, fish stocked per aquarium will be batch weighted and counted at stocking and harvesting in order to calculate the average individual

weight and growth. The individual weight of the five fish taken for gut sampling on day 15 and 30 will also be measured. A minimum stocking density of 30 fish per experimental unit was chosen to obtain sufficient biomass for proximate analyses at the end of the experiment.

Husbandry conditions:

The husbandry setup will be the same for each experiment. Fish are housed in 60 liter (effective volume) aquaria integrated in a recirculating aquaculture system to maintain water quality. Fish behaviour and water quality will be checked on a daily basis conform standard **Carus** procedures, using the clinical score sheet recording system. A detailed experimental protocol, outlining all procedures, will be attached to the clinical score sheet for each experiment. For experiment 4, trout and tilapia will be housed in different recirculating aquaculture systems, considering difference in temperature and water quality requirements.

Experiment 1:

Juvenile tilapia (1 g individual start weight) will be used to determine the effect of life and dead bioflocs on gut functioning. A total of 4 experimental diets will be used with a set concentration of: (1) dried dead biofloc; (2) dried bioflocs; (3) ingredients matching biofloc composition and (4) a concentration of "fresh" bioflocs from the water, treatments will be executed in triplicate. The animals will be housed in 60-liter aquaria with a total of 30 fish per aquarium at the start of the experiment. At the start of the experiment 60 fish taken from the base population will be sampled to determine their proximate composition and gut microbiota composition before the onset of the experiment. Sixty fish (1-1.5 g individual weight) are needed to provide sufficient biomass to determine the proximate composition, except for fat. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. These fish will be euthanized using the anaesthetic TMS of which an overdose will be administered after unconsciousness sets in. Each of these fish will be subsequently disinfected, the gut will be removed aseptically, gut resident microbiota will be collected for Illumina MiSeq (to perform microbial community species identification) and gut cell scrapings will be collected for mRNA analysis (to analyse gene expression). The remainder of the fish will be euthanized on day 30 and culled for proximate analyses. Handling of the fish will be avoided as much as possible. When handling is unavoidable (e.g. weighing at start of the experiment) the fish will be anaesthetized to minimize discomfort.

Experiment 2:

Juvenile tilapia (1 g individual start weight) will be used to determine the effect of biofloc dose in the diet on gut homeostasis. Four different experimental diets will be tested. The concentrations of bioflocs and whether dead or live bioflocs will be used depends on the outcome of experiment 1. Group size and sampling procedures will be the same as for experiment 1.

Experiment 3:

Juvenile tilapia (1 g individual start weight) will be used to determine the effect of both pure grade and biofloc derived PHB in the diet on gut homeostasis and functioning. Group size and sampling procedures will be the same as for experiment 1.

Experiment 4:

Nile tilapia and rainbow trout (1 g individual start weight) will be used to determine the reducing effects of bioflocs on soya induced enteritis. The composition of test diets will be based on experience gained during previous experiments. Sampling procedures will be the same as for experiment 1.

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

The Nile tilapia will be obtained from Til-Aqua (Velden, the Netherlands), the rainbow trout will be obtained from Mohmen GmbH (Stolberg-Gressenich,

Germany). The tilapia will arrive when they are approximately 0.1 gram individual weight. The trout will be approximately 0.1-0.5 gram individual weight at arrival, depending on availability. After arrival, fish will be stocked according to the general protocol and receive a larval commercial diet until they reach the wanted individual start weight of 1 g.

Twenty percent of the number of animals used in the experiment will serve as 'back-up' animals. A total of 18 fish per treatment (6 per experimental unit) will receive the same diets and housing conditions as the experimental animals. The intention is to maintain the back-up fish at a similar average weight as the experimental fish. If mortality occurs, back-up fish will be relocated to the relevant experimental unit. Replicates with a mortality higher than 20 % will be stopped. Back-up fish which are not used during the experiment will be culled at the end of the experiment.

- At the start of each experiment the 1 g fish will be gently caught using a small net.
- Subsequent to that, the fish will be mildly sedated using TMS after which the fish will be weighted. A total of 60 fish will receive an additional dose of TMS. When euthanized they will be sampled for initial state analyses.

• The experimental animals will be randomly assigned to the experimental units. Random assignment of fish to the experimental units will be done by taking the 360 fish one by one and using randomly generated numbers without repetition between 1 and 360 per fish (Iphone application 'random #'). Fish 1-30 will be stocked in aquarium 1, 31-60 in aquarium 2, etc.

While distributing the 360 fish in 12 batches of 30 fish, the fish are anesthetized and each of the 12 batches will be stocked in a separate bucket. After the fish regain consciousness in the buckets, they will be transferred to the assigned aquarium.

- At day 15 and 30 five randomly assigned fish will be gently caught and euthanized using TMS of which an overdose will be administered after unconsciousness sets in.

• The fish are kept in a 12:12 hr light dark regime

• The fish will be fed twice daily with appropriate and full diets. An exception to the latter are the diets of experiment 4. These treatments will receive a high dose of soya in the diet, the control group of rainbow trout is expected to experience moderate discomfort due to soya-induced enteritis. Based on literature, it is to be expected that the experimental treatments besides the control will not experience this discomfort due to the positive effects of the bioflocs added to the diets.

- Besides the above describes procedures the fish will not be disturbed.

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

The choice to sample 5 fish per sampling point per experimental unit was made for statistical reasons, because from previous experiments performed by Giatsis et al. (2014)* we know that 5 fish per sampling provides sufficient statistical power with the proposed statistical- (e.g. PERMANOVA) and bioinformatical methods. Using 3 fish per sampling point (6 possible unique permutations) results in a minimum statistical probability of > 10%. When using 4 fish per sampling point (26 unique permutations) the minimum statistical probability is 4.2 %. The minimum probabilities with both 3 and 4 fish per sampling point is too high, while using 5 fish per sampling point (120 unique permutations) will result in a maximum probability <1 % which is adequate.

note: Giatsis, C., D. Sipkema, H. Smidt, J. Verreth and M. Verdegem (2014). "The Colonization Dynamics of the Gut Microbiota in Tilapia Larvae." PLoS ONE 9(7): e103641.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Animals used:

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, silver/wild type, natural all male population)
Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, wild type)

Origin:

Nile tilapia: Til-Aqua, Velden, the Netherlands
Rainbow trout: Mohmen GmbH (Stolberg-Gressenich, Germany)

Estimated number:

Nile tilapia:

Experiment 1: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish
Experiment 2: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish
Experiment 3: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish
Experiment 4: 60 fish for initial state + (4 * 3 * 30 = 360 fish) = 420 fish +

1680 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish
Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish
Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish
Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish +

288 fish

Rainbow trout:

Experiment 4: 60 fish for initial state + 4 * 3 * 30 = 360 fish = 420 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Total use of experimental animals during project: 2100 fish

Total use of experimental animals during project: 360 fish +

2460 fish

At the start of each experiment 60 fish of the base population of Nile tilapia or rainbow trout will be sampled for proximate analysis. In total 240 Nile Tilapia and 60 rainbow trout will be sampled before the onset of the experiments.

Life stages:

Experiment 1-4: 1-10 gram fish individual weight

Groups of 30 fish are stocked because this is the number of fishes sampled and analyzed: 5 fish sampled on day 15, 5 fish sampled on day 30 and the proximate composition of the remaining 20 fish will be determined at the end of the experiment. Housing 30 fish in a 60-l aquarium is adequate for fish to display good feeding behaviour. Within a few days after stocking the fish will be adapted to the housing conditions and feeding schedule. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. During the experiment, the biomass increases. By culling fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed. Previous experiments showed that a sample size of 5 animals is sufficient for statistical analysis of this type of data (Giatsis et al. 2014; see end of section A). The remaining 20 animals will be used for proximate analyses (to determine growth and nutrient efficiency in the different treatments). The 160-200 g total fish biomass of the 20 fish collected at the end of the experiment is just sufficient to perform proximate analysis.

The choice for tilapia as an experimental animal is a logical consequence of the importance of this species to worldwide aquaculture, the current use of this

kind in biofloc systems and their nature as a filter feeder. Much is known about tilapia and most literature available regarding fish farming in biofloc systems is based on experiments with shrimp or tilapia. During the last experiment rainbow trout and Nile tilapia will be used to elaborate the effects of bioflocs, or its components, on the gut functioning and health of carnivorous fish.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

- No, continue with question D.
 Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

- No
 Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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.

Little is known about the influences of bioflocs on the health and growth of fish. Due to the complexity of the processes in the intestine of fish, in this case there is a need for in situ research. Unfortunately there is no alternative for using fish to answer the fundamental issues addressed in the project. Groups of 30 fish are stocked because at a lower density it is difficult to get all fish to react well to the administrated feed. Within a few days fish get adapted to the housing conditions and feeding schedule. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. During the experiment, the biomass increases. By culling fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed. Previous experiments showed that a sample size of 5 animals is sufficient for statistical analysis of this type of data (Giatsis et al. 2014; see end of section A). The remaining 20 animals will be used for proximate analyses (to determine growth and nutrient efficiency in the different treatments). The biomass of the 20 fish collected at the end of the experiment (160-200 g total weight) represents the minimum sample size required.

The number of laboratory animals used in the experiment is the minimum number required to obtain the number and size of samples needed for the analytical analyses. The experimental diets fed to the fish are complete diets providing all necessary macro and micro nutrients.

If more than 20 % of the fish stocked in an aquarium died, the remaining fish in the aquarium will be culled (In other words, one replicate of a treatment will be stopped). Fishes of 1-10 g rarely display external signs of disease and quickly die under adverse conditions. Therefore, mortality of 20% of fishes in a group was set as human end-point.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Fish will be stocked with 30 fish per experimental unit, in this way natural feeding behaviour can be displayed. During the experiment, the biomass increases. By culling fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed. Water quality parameters will be kept at an adequate level. Handling the fish will be kept to a minimum, when handling cannot be avoided fish will be treated with an anaesthetic. No adverse effects on the environment are expected to occur during this project.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is None of the experiments proposed has been executed previously. This is ensured by in-depth consultation with colleagues working in the same field and extensive literature research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

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.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

During experiment 4 the fed diets will contain soya. Soya rich diets induce enteritis. In our experiment, the level of inflammation will be highest in the control diet. Microbiota are known to reduce development of enteritis and biofilms are rich aggregates of microbes. Hence, in the other treatments fish discomfort is expected to be less. The soya inclusion level in the control will be such that the inflammation level will be moderate. Anti-inflammatory substances or pain relieving medication cannot be used because this would counter the expected physical reaction.

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other aspects other than 'mild' or 'moderate' as described under K. are expected during execution of the experiments. Carus has a backup power unit in case of energy failure. A disease outbreak cannot be fully prevented.

Explain why these effects may emerge.

Disease outbreak: not possible to hypothesize at this point in time. Common causes are cross infection with other experiments in Carus, intake of new fish already carrying the disease; etc.

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

Disease outbreak: experiments in separate room; follow strictly hygiene protocols; disinfection of experimental units prior to start of experiments; obtain experimental fish from trustworthy sources; follow quarantine procedures of Carus for newly obtained fish; consultation with the experimental animal expert of WU (drs. R. Steenmans) in case of observed abnormal fish behaviour or disease outbreak.

J. 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 K.

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

If circumstances such as a disease outbreak cause more than 20% mortality in one or more experimental units fish will be, after consulting the experimental animal expert, euthanized to prevent further distress. Continuation or termination of the experiment in such a case will be decided in consultation with drs.

R. Steenmans.

Fishes of 1-10 g rarely display external signs of disease and quickly die under adverse conditions. Therefore, mortality of 20% of fishes in a group was set as human end-point. Animals will be checked daily for signs of distress: feeding and swimming behavior, signs of lethargy and external signs (skin and fin damage & coloration, external infections, eye color, etc.)

Indicate the likely incidence.

The possibility of a mortality exceeding the proposed maximum level of 20 % is very small. The severity of discomfort any treatment will impose on the fish are targeted to be moderate (through experimental design) and are highly unlikely to cause mortality.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

All procedures as elucidated under section A are expected to cause mild discomfort at maximum. An exception to this is that during experiment 4 the fed diets will contain elevated levels of soya-protein. This will most probably induce enteritis, the severity of this condition will be highest in the control diet. In the control the maximum inclusion level is used without the presence of bioflocs, which are known to have a beneficial effect on enteritis. The fish of this group will suffer moderate discomfort due to the inflammation. At the end of the experiments all fish will be anesthetized and killed. In summary:

*Experiment 1: all treatments mild discomfort

*Experiment 2: all treatments mild discomfort

*Experiment 3: all treatments mild discomfort

*Experiment 4: control treatment moderate discomfort; all other treatments mild discomfort

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

- No > Continue with Section 3: 'signatures'.
 Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The gut microbiome, transcriptome and enzymatic activity of the 5 animals per experimental unit sampled on day 15 and 30. The animals will be killed before dissecting out the gut. The fish used in proximate analyses on day 0 and 30 will be killed prior to analyses. The number of fish stocked in each experimental unit is such that all experimental animals are used in analyses.

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



4

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

WUR

[REDACTED]
Akkermaalsbos 12
Postbus 59
6700 AW Wageningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD10400201544

Uw referentie

Bijlagen

Datum 23 maart 2015
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [REDACTED],

Op 13 februari 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bioflocs, the key to feed fish more with less". De aanvraag is momenteel bij ons in behandeling en wij hebben een aantal aanvullende vragen om de beoordeling af te kunnen ronden.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig:

- 1: In het 'project proposal' formulier wordt bij experiment 1 van vier andere voedselregimes uitgegaan dan in het 'animal procedures' formulier. Welke is de juiste?
- 2: In de navolgende experimenten is de keuze en opzet voor 4 groepen met een ander regime niet duidelijk. Anders gezegd: licht toe op welke wijze a priori al de keuze gemaakt kan worden voor vier voedselregimes per experiment.
- 3: Het OBDA wil graag beargumenteerd zien wat go en no-go momenten zijn die de onderzoekers doen besluiten om door te gaan naar het volgende experiment en in welke vorm.
- 4: De redenatie achter het aantal backup-dieren is niet geheel duidelijk. Licht toe wat de bandbreedte is in verwachte uitval in reguliere kweek. Is er ook additionele sterfte te verwachten door de behandelingen? Het is wel evident dat de biomassa in de testbakken gelijk moet blijven omdat anders de groei van de dieren in elke replica beïnvloed wordt door een andere biomassa-water verhouding.
- 5: Om welke reden is bij bepalingen achteraf een veel hogere biomassa nodig dan aan het begin van het experiment?

6: Over enteritis bij experiment 4: De ongeriefsinschatting op de NTS en het 'description animal procedures' formulier zijn niet consistent. Geef de beschrijving die volgens u juist is en pas zo nodig de NTS aan.

Datum
23 Februari 2015
Onze referentie
AVD10400201544

Opsturen informatie

De CCD zou de gevraagde informatie graag zo snel als mogelijk, doch binnen de voorgeschreven termijn van 14 dagen van u ontvangen. Totdat de antwoorden binnen zijn, staat de behandeltijd stil. U kunt deze informatie aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen, nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



P.O. Box 338 | 6700 AH Wageningen | The Netherlands

Centrale Commissie Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
 www.zbo-ccd.nl

Department of
 Animal Sciences

DATE
 March 26, 2015

SUBJECT
 Aanvullende Informatie
 vergunningsaanvraag

YOUR REFERENCE
 AVD10400201544

OUR REFERENCE
 [REDACTED] 015/1989/[REDACTED]

POSTAL ADDRESS
 P.O. Box 338
 6700 AH Wageningen
 The Netherlands

VISITORS' ADDRESS

[REDACTED]
 [REDACTED] Wageningen

INTERNET
 www.wageningenuniversity.nl

CoC NUMBER
 09215846

HANDLED BY

[REDACTED]

TELEPHONE
 +31 (0) [REDACTED]

FAX
 +31 (0) [REDACTED]

EMAIL
 [REDACTED]@wur.nl

Dear Beste leden van de CCD,

Antwoorden op uw vraag naar aanvullende Informatie gesteld op 23 maart 2015 zijn bijgesloten.

Naar aanleiding van vraag 6, hebben we een wijziging gemaakt in sectie 3.4. van de 'Niet-technische samenvatting'. Een aangepaste versie is bijgesloten. Naar aanleiding van dezelfde vraag stellen we ook een kleine wijziging voor in de 'Appendix: Description animal procedures'. Deze wijziging is toegelicht bij het antwoord op vraag 6. Ook dit gewijzigd document is bijgesloten.

Deze brief stuur ik ook cc. aan de eigen IvD zodat zij ook op de hoogte en in het bezit zijn van de (voorgestelde) wijzigingen aan de 'Niet-technische samenvatting' en 'Appendix: Description animal procedures'.

Voor de duidelijkheid werden de vragen herhaald bij de antwoorden:

=====Questions and Answers=====

1. In het 'project proposal' formulier wordt bij experiment 1 van vier andere voedselregimes uitgegaan dan in het 'animal procedures' formulier. Welke is de juiste?

Answer:

The feeding regimes are the same. Some confusion might arise from using different terminology and from listing the treatments in a different order. In the table below, the descriptions of the two documents are matched:

Form: Project proposal	Appendix Description animal procedures
A: control (based on standard tilapia diet formulation) ¹	(3) Ingredients matching biofloc composition
B: 10% live bioflocs from water + ...	(4) concentration of "fresh" bioflocs from the water
C: 10% dried biofloc in feed + ...	(2) dried bioflocs
D: 10% dried dead bioflocs in feed + ...	(1) Dried dead bioflocs

¹ The base diet will contain a 10% fraction matching biofloc composition (based on proximate analysis). In this way, all diets will have a similar proximate composition.

2. In de navolgende experimenten is de keuze en opzet voor 4 groepen met een ander regime niet duidelijk. Anders gezegd: licht toe op welke wijze a priori al de keuze gemaakt kan worden voor vier voedselregimes per experiment.

Answer:

All experiments are limited to 4 treatments because there are limits to the work load that can be handled by the research team for sample collection, sample preparation for analysis, laboratory analyses, data processing and interpretation.

- Experiment 2 is a dose-response study, which will analyse 4 different biofloc concentrations in the diet. A minimum of 4 biofloc concentrations is necessary to fit a dose-response regression through the data points.
 - Experiment 3 is a 'modes of action' study which will analyse the effect of PHB-type (pure grade vs. biofloc-based PHB) and PHB concentration (2 factors, each with 2 levels) in a 2x2 factorial design. Two levels is the minimum possible per factor.
 - Experiment 4 is split in 2 sub-experiments, one with tilapia and one with trout. At this stage it is not known if 1 factor or 2 two factors will be involved. In case of 1 factor it will be a dose-response study, in case of 2 factors it will be a 2x2 factorial design. In both cases, the minimum number of treatments is 4 (as explained above for either experiment 2 or 3).
3. Wij willen graag beargumenteerd zien wat go en no-go momenten zijn die de onderzoekers doen besluiten om door te gaan naar het volgende experiment en in welke vorm.

Answer:

The sequence of the experiments, and thus research question for each experiment, is fixed. The outcome(s) of the previous experiments are presently unknown. Treatments which gave the best results, will be considered to design the basic treatments in follow up experiments. So, in this sense, it is not a go & no-go decision, as formulated in the question. In the 'Project proposal' and 'Description animal procedures' documents for this reason we referred to milestones or decision points for experimental design, not to go or no-go decisions.

4. De redenatie achter het aantal backup-dieren is niet geheel duidelijk. Licht toe wat de bandbreedte is in verwachte uitval in reguliere kweek. Is er ook additionele sterfte te verwachten door de behandelingen? Het is wel evident dat de biomassa in de testbakken gelijk moet blijven omdat anders de groei van de dieren in elke replica beïnvloed wordt door een andere biomassa-water verhouding.

Answer:

The expected mortality due to the experimental treatments is expected to be 0%. Even in the one treatment in experiment 4 with 'moderate' discomfort we expect no treatment related mortality. However, we cannot exclude with 100% certainty a disease outbreak or problem with husbandry/water quality management, causing mortality.

If more than 20% of the animals in an experimental unit die during the experiment, this unit will be removed from the experiment. This is the reason we do not keep more than 20% of the initial number of fishes stocked in the experiment as back-up animals.

5. Om welke reden is bij bepalingen achteraf een veel hogere biomassa nodig dan aan het begin van het experiment?

Answer:

Normally, all lab analyses are duplicated, so we can check for inconsistent results. To do the latter one needs extra sample material. For proximate analysis 160 g fish biomass is a safe minimum to obtain results backed up with additional analyses in case of inconsistent results. With proximate analysis, all analyses with the exception of fat content can be done, including additional analyses in case of inconsistent

results, with 40 g of fish biomass. The remaining 120 g are needed to analyse fat content. If only 60 g of fish biomass is available, an estimate of the fat content can be obtained, but with no option for additional verification in case of inconsistent results.

At the end of each experiment, per experimental unit, fat deposition will be estimated by subtracting the amount of fat present at the end of the experiment with the amount of fat present in fishes stocked at the beginning of the experiment. Because the biomass at the start of the experiment is relatively small (< 12%) compared to harvested biomass, the possible error in the estimate of fat deposition will also be relative small. In addition, the same error will apply to all treatments. In contrast, at the end of the experiment, it is important to have a precise estimate of the fat content per experimental unit in fish tissue, so treatment effects can be quantified. A lower precision in the estimated fat content at the start of each experiment, will not affect the statistical analyses (same error in all treatments). This explains why a smaller fish biomass for proximate analysis can be used at the start of the experiment than at the end of the experiment for proximate analysis. In this way, the number of animals sacrificed in the experiment was minimized.

6. Over enteritis bij experiment 4: De ongeriefsinschatting op de NTS en het 'description animal procedures' formulier zijn niet consistent. Geef de beschrijving die volgens u juist is en pas zo nodig de NTS aan.

Answer:

The text in the 'niet technische samenvatting' has been re-formulated into: De vissen (tilapia en forel) worden gewogen en geselecteerd (onder verdoving) en zullen daarvan hoogstens 'mild' ongerief ondervinden. Het voer voor forel bevat plantaardig eiwit (soja). Dat kan in de controlebehandeling – waar mogelijke ontstekingen in de darm veroorzaakt door soja niet worden afgeremd door toevoeging van blovlokken – leiden tot 'matig' ongerief.

In the 'Appendix: Description animal procedures' at the end of section 'J. Humane endpoints' we suggest to change the text "The severity of discomfort any treatment will impose on the fish are targeted to be moderate (through experimental design) and are highly unlikely to cause mortality." to replace with "The severity of discomfort any treatment will impose on the fish are targeted to be moderate at most (through experimental design) and are highly unlikely to cause mortality."

With kind regards,

[Redacted signature block]

cc. [Redacted]
IvD [Redacted]

Attachments with e-mail:

- 2015-03-26 Niet Technische Samenvatting_Bioflocs-aangepast AVD10400201544.doc
- 2015-03-26 Appendix-Description Animal Procedures_Bioflocs - aangepast AVD10400201544.doc

DATE
March 26, 2015

OUR REFERENCE
2015/1989

PAGE
3 of 3

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

WUR

Akkermaalsebos 12
6700 AW Wageningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD 10400201544

Uw referentie

Bijlagen

30-03-2015

Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [REDACTED]

Op 30 maart hebben wij antwoorden ontvangen op de door ons gestelde vragen in onze brief met als kenmerk 10400201544, waarvoor hartelijk dank. Het gaat over uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven met als titel 'bioflocs, the key to feed fish more with less'.

Welke informatie nog nodig

Bij het beantwoorden van de vragen hebben wij over vraag 4: nog niet alle informatie die wij nodig hebben om de aanvraag definitief te beoordelen.

Vraag 4: De redentatie achter het aantal backup-dieren is niet geheel duidelijk. Licht toe wat de bandbreedte is in verwachte uitval in reguliere kweek. Is er ook additionele sterfte te verwachten door de behandelingen? Het is wel evident dat de biomassa in de testbakken gelijk moet blijven omdat anders de groei van de dieren in elke replica beïnvloed wordt door een andere biomassa-water verhouding.

In uw antwoord geeft u weer dat de mortaliteit die door de behandeling veroorzaakt wordt naar verwachting 0% is. Er is nog niet ingegaan op de vraag wat de reguliere uitval naar verwachting is. Ook niet wat de redentatie is achter het getal van 20% backup-dieren en het daaraan gekoppelde humane eindpunt bij meer dan 20% sterfte.

-Kunt u alsnog toelichten hoeveel reguliere uitval u verwacht?

-kunt u alsnog de redentatie geven om het aantal proefdieren met 20% aan backup dieren te verhogen en daarbij het humane eindpunt van 20% te hanteren, ter verduidelijking, dus niet een hoger of lager getal?

Opsturen informatie

De CCD zou de gevraagde informatie graag zo snel als mogelijk ontvangen doch uiterlijk binnen de voorgeschreven periode van 14 dagen. U kunt deze informatie aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen, nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Datum

30-03-2015

Onze referentie

AVD 10400201544



Centrale Commissie Dierproeven i.o.

Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager

Postcode

Huisnummer

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam

Datum

- - 20

Handtekening



P.O. Box 338 | 6700 AH Wageningen | The Netherlands

Centrale Commissie Dierproeven
Postbust 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

Department of
Animal Sciences

DATE
March 31, 2015

SUBJECT
Aanvullende informatie
vergunningsaanvraag

YOUR REFERENCE
AVD 10400201544

OUR REFERENCE
[REDACTED] 988 [REDACTED]

POSTAL ADDRESS
P.O. Box 338
6700 AH Wageningen
The Netherlands

VISITORS' ADDRESS
[REDACTED]
[REDACTED] Wageningen

INTERNET
www.wageningenuniversity.nl

CoC NUMBER
09215846

HANDLED BY
[REDACTED]

TELEPHONE
+31 (0)317 [REDACTED]

FAX
+31 (0) [REDACTED]

EMAIL
[REDACTED]@wur.nl

Beste leden van de CCD,

De volgende vraag werd gesteld:

In uw antwoord [op vraag 4] geeft u weer dat de mortaliteit die door de behandeling veroorzaakt wordt naar verwachting 0% is. Er is nog niet ingegaan op de vraag wat de reguliere uitval naar verwachting is. Ook niet wat de redenatie is achter het getal van 20% backup-dieren en het daaraan gekoppelde humane eindpunt bij meer dan 20% sterfte.

- Kunt u alsnog toelichten hoeveel reguliere uitval u verwacht?
- kunt u alsnog de redenatie geven om het aantal proefdieren met 20% aan back-up dieren te verhogen en daarbij het humane eindpunt van 20% te hanteren, ter verduidelijking, dus niet een hoger of lager getal?

Antwoord:

Onze ervaring is dat reguliere uitval bij normale houderij bij deze soorten in dit groeitraject (1 - 10 g) gemiddeld 5% is (proefaccommodatie standaard, [REDACTED]). Echter, bij sommige proeven krijgen we te maken met hogere sterfte. Dit kan zijn door een probleem met het houderij-systeem (e.g. pomp defect, verstopte overloop, ...) of door het optreden van een infectie. Technisch problemen worden meestal snel opgelost. Bij uitval door ziekte houden we 20% aan als humaan eindpunt, omdat:

- Er duidelijk onderscheid gemaakt moet kunnen worden tussen reguliere uitval en uitval door ziekte. Door variatie tussen experimentele units ligt reguliere uitval meestal beduidend onder de 5%, maar kan ook oplopen in uitzonderlijke gevallen tot 10 - 15%. Een humaan eindpunt van 20% onderscheid zich met zekerheid van reguliere uitval (= reden voor niet een lager percentage dan 20%).
- Dagelijkse observaties van gedrag van visgroepen in experimentele units laten toe snel onregelmatigheden, en een mogelijk ziekte uitbraak te voorspellen. Dit laat toe snel maatregelen te nemen, inclusief contact opnemen met de artikel 14 proefdierdeskundige [REDACTED]. Als desondanks de ziekteontwikkeling doorzet, en sterfte uitstijgt boven 20%, dan geeft dit aan dat genomen maatregelen niet effectief waren en dat meer dieren zullen lijden onder de ziekte. Dan is het beter de experimentele unit in overleg met de proefdierdeskundige uit de proef te verwijderen om verder lijden te voorkomen (= reden voor niet een hoger percentage).
- Zieke dieren hebben minder eetlust en zijn minder actief dan gezonde dieren. Dit project gaat om onderzoek waarbij voedselopname en groei belangrijke

DATE
March 31, 2015

OUR REFERENCE
[REDACTED] 988/M [REDACTED]

PAGE
2 of 2

uitleesparameters zijn. Bij hoge uitval door ziekte worden onderzoeksresultaten niet meer representatief (= extra reden voor stopzetten bij bereiken van 20% uitval).

Yours sincerely,

[REDACTED]

cc.:

[REDACTED]
IvD [REDACTED]

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD10400201544
2. Titel van het project: Bioflocs, the key to feed fish more with less
3. Titel van de NTS: Meer met minder / Bioflocs, the key to feed fish more with less
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam: DEC Wageningen Universiteit
 - telefoonnummer contactpersoon: 0317- [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]@wur.nl
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 04-02-2015
 - aanvraag compleet: ja
 - in vergadering besproken: 16-02-2015
 - anderszins behandeld: nee
 - termijnonderbreking(en) van 19-02-2015 tot 23-02-2015
van 02-03-2015 tot 02-03-2015
 - aanpassing aanvraag: ja (zie 8.)
 - advies aan CCD 06-03-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: nee

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum 19-02-2015
- De DEC heeft vragen gesteld m.b.t.:
 - Een uitvoerigere onderbouwing van het aantal benodigde dieren, zowel voor de proefgroepen als voor de reservedieren;
 - Een explicietere beschrijving van humane eindpunten (indicatoren);
 - Een uitgebreidere toelichting in de niet-technische samenvatting bij 'vervanging' op de vraag waarom er geen alternatief voorhanden is;
 - Enkele redactionele opmerkingen.
- Datum antwoord 23-02-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Op basis van bovenstaande vragen is de projectaanvraag door de aanvrager aangepast. In de huidige versie is voldoende tegemoet gekomen aan de vragen van de DEC.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord: het onderzoek heeft primair niet een onderwijskundig doel, maar het betreft een PhD-project, waar ook MSc-studenten bij worden betrokken.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een reëel belang. De DEC is van mening dat het project kan bijdragen aan wetenschappelijk inzicht in en mogelijkheden tot verbetering van voeding en (darm)gezondheid bij vis door het gebruik van biovlokken. Tevens draagt het bij aan een vermindering van het eiwitgebruik in de visteelt, hetgeen vanuit het streven naar duurzame productie een maatschappelijke relevantie heeft.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het betreft een voerproef, waarbij verschillende diëten worden onderzocht en waarbij de vissen onder normale condities worden gehouden. Voor één behandelingsgroep is het ongerief ingeschat op matig ongerief. De overige dieren worden niet blootgesteld aan extra proefdierkundige handelingen, die meer dan gering ongerief kunnen veroorzaken.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De onderzochte processen en interacties zijn alleen te bestuderen in levende dieren en kunnen niet nagebootst worden buiten het dier.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De gekozen aantallen zijn minimaal nodig om de benodigde analyses te kunnen uitvoeren. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Het ongerief voor de dieren is minimaal. De betrokken onderzoeksgroepen beschikken over jarenlange expertise met deze soorten, die het aanbieden van een optimale leefomgeving garanderen.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Het belang van de doelstelling wordt door de DEC onderschreven, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. Het onderzoek is in eerste instantie mechanistisch van aard, gericht op het onderzoeken en verklaren van processen. Op termijn kan meer inzicht hierin bijdragen aan het milieuvriendelijker maken van de aquacultuur, het verlagen van vismeelgebruik in visvoerders, het verhogen van de darmgezondheid en het verminderen van ziektegevoeligheid van kweekdieren. Dit doel weegt op tegen het ingeschatte ongerief voor de dieren. Bij de dierproeven en hun verzorging, behandeling en huisvesting wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. Voor het nastreven van deze doelstelling is dit gebruik van dieren naar het oordeel van de commissie ethisch aanvaardbaar.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert unaniem de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen Universiteit

Postbus 59
6700 AW Wageningen

Centrale Commissie
Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)

Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
10400201544

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 23 april 2015
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw,

Op 13 maart 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Bioflocs the key to feed fish more with less' met aanvraagnummer AVD10400201544. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met het project starten. De vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 mei 2015 tot en met 31 december 2017.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de dierexperimentencommissie (DEC-Wageningen Universiteit). Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige

Datum
23-04-2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
10400201544

voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 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.

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Wageningen Universiteit
Adres: Postbus 59
Postcode en woonplaats: 6700 AW Wageningen
Deelnemersnummer: 10400

Deze projectvergunning voor het tijdvak 01-05-2015 tot en met 31-12-2017, voor het project Bioflocs, the key to feed fish more with less' met aanvraagnummer AVD10400201544, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen Universiteit. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is universitair docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. Een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13-maart-2015
2. De bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - Projectvoorstel, zoals ontvangen bij brief op 13-maart-2015;
 - Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij brief op 13-maart-2015.
 - Advies van dierexperimentencommissie d.d. 06-maart-2015, ontvangen op 13-maart-2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
-Experiment 1:	Tilapia	492	Licht	Geen
-Experiment 2:	Tilapia	492	Licht	Geen
-Experiment 3:	Tilapia	492	Licht	Geen
-Experiment 4	Tilapia + regenboogforel	492 + 492	Licht + maximaal matig in 108 tilapia en 108 regenboogforel	Geen

Datum
23-04-2015

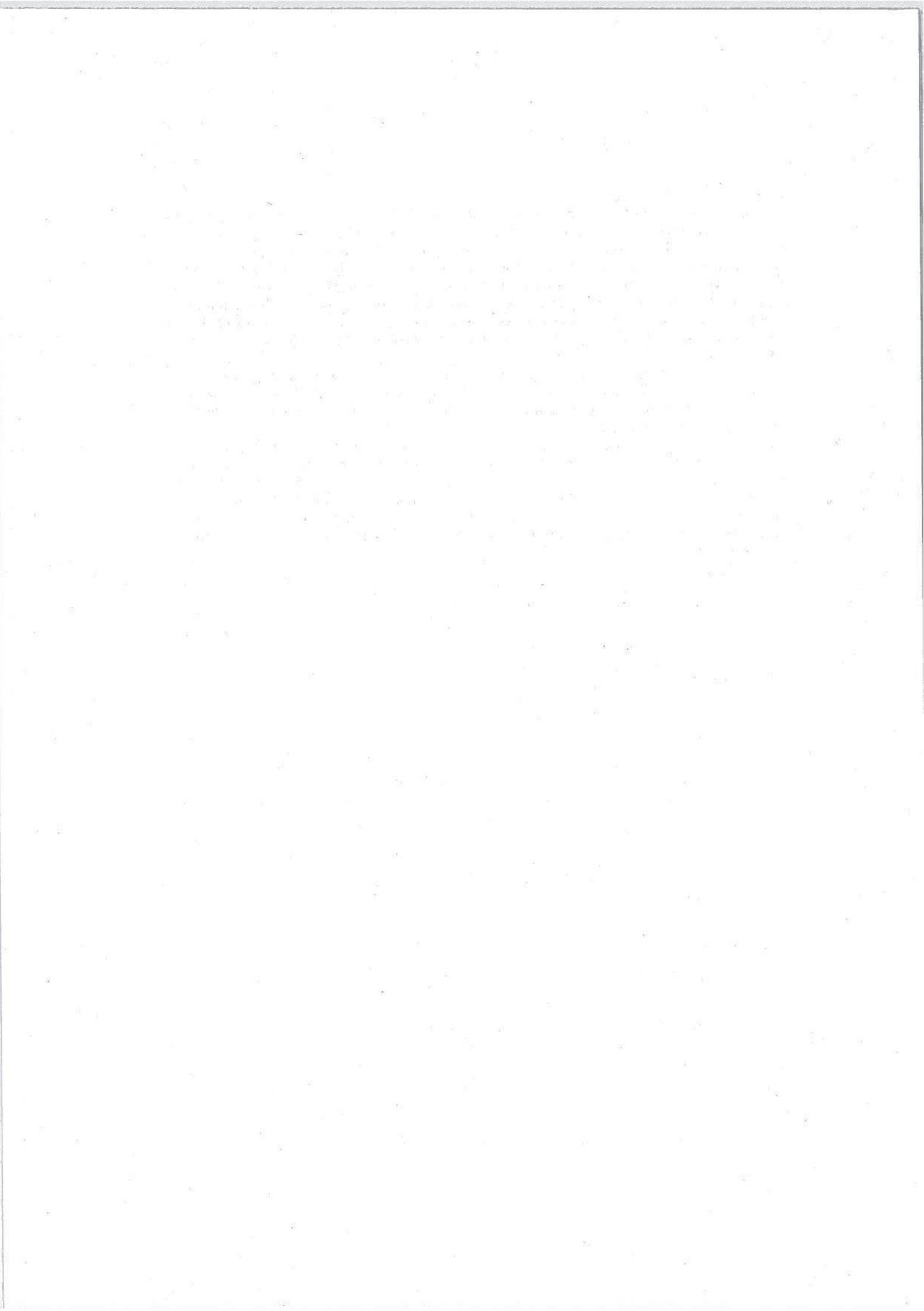
Onze referentie
Aanvraagnummer
10400201544

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 blijvende 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 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 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 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.





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.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 40100
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting DLO
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	9 0 9 8 1 0 4

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	Akkermaalsbos	12
Postbus	59	
Postcode en plaats	6700AW	Wageningen
IBAN	NL10RABO0397066465	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	Wetenschappelijk medewerker	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	Wetenschappelijk medewerker	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nee |

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 |
| <input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 |

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recomb |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Opwekken van een antigeen-specifieke immuunrespons in lama's om specifieke antilicha |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------|
| Naam DEC | DEC-DLO |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ~~Melding Machtiging~~ DEC-advies
- 2 x Description animal procedures
- order WUR839093 tbv factuur

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:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- 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.
- 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	[REDACTED]
Functie	gemandateerd vergunninghouder
Plaats	Wageningen
Datum	4 - 3 - 2015
Handtekening	[REDACTED]

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 our website (www.zbo-ccd.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

40100

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

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.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Monoclonal antibodies (mAbs) are since long valuable tools in various diagnostic applications. The last two decades they are being used also for therapeutic applications in humans and animals. An example is the mAb Synagis® that is used to help prevent a serious lung disease caused by respiratory syncytial virus (RSV) in children at high risk for severe lung disease from RSV. Most mAbs are isolated by immunisation of mice and hybridoma technology.

Biochemically mAbs exist of a heavy and a light antibody polypeptide chain that are both needed for binding to an antigen. Since 1993 it is known that camelids (camels, dromedaries and llamas) make a special class of antibodies that exist of only two heavy antibody chains. The N-terminal domains of these heavy-chain antibodies are called nanobodies®. They can be isolated from peripheral blood lymphocytes (PBLs) of immunized llamas using phage display technology. Phage display is a powerful molecular biological technology where one can retrieve antigen binding nanobodies from large libraries of more than a billion clones. For this purpose RNA is extracted from PBLs, converted into cDNA and used for PCR amplification of nanobody genes. These genes are then inserted into a phage display vector. Nanobodies offer a number of advantages for biotechnological applications as compared to conventional mAbs or recombinant antibody fragments derived from conventional mAbs (Harmsen and De Haard, 2007; De Meyer et al., 2014):

- 1) high biophysical stability, enabling application in harsh environments.
- 2) efficient production in microorganisms, enabling more facile and cheap production.
- 3) great amenability for phage display selection due to coding by a single gene, resulting in high functional phage display libraries.
- 4) highly suitable for making genetic fusions to other nanobodies (multimers), enabling production of more potent nanobody multimers and bispecific nanobody multimers. Bispecific antibodies are especially important for therapy. One can for example make bispecific nanobodies against a tumor antigen and a cytotoxic T-cell for recruitment of cellular immunity to fight cancer. Note that conventional mAbs are always monospecific.
- 5) recognition of cryptic antigenic sites, often in cavities such as enzyme active sites, that are not recognized by conventional antibodies. This enables for example enzyme neutralization.
- 6) efficient tissue penetration, which can be important for example for neutralization of snake or scorpion toxins.
- 7) highly soluble.

Since that time [redacted] immunises llamas (Lama glama) because these animals are relatively easy to handle and house. [redacted] also does contract research for third parties, often companies, with the aim to isolate nanobodies against specific antigens that the client delivers. The products that we then generate are llama sera and RNA isolates from PBLs of immunized llamas that are suitable for cDNA synthesis and further construction of phage display libraries or other methods for isolation of specifically antigen binding nanobodies. These nanobodies are to be used in biotechnological applications. Due to the expiration of a number of basic patents on nanobodies there is a rising interest in nanobodies. In a recent review (De Meyer et al., 2014) an overview of nanobody applications is given.

References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol. 32, 263-70.
Harmsen, M.M., De Haard, H.J., 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 13-22.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of the project is to isolate nanobodies that bind specifically to particular antigens. The nanobodies to be isolated will be applied in human or veterinary diagnostics or therapy. The research is therefore applied or translational. The following three objectives are likely to be pursued by the coming years.

A) Use of nanobodies in diagnostic tests for human and animal diseases

For example in Research and Development (R&D) or Quality Control (QC) of veterinary vaccines, especially foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine. For this purpose the nanobodies are used in laboratory tests to determine the concentration and quality of the active ingredients in vaccines during the production process. In case of FMDV we have found nanobodies that bind specifically to intact (146S) FMDV virions but not to their discrete (12S) degradation products. These rare nanobodies have proven valuable to determine the stability of FMDV vaccines, which led to the discovery that a preservative that is often used in such vaccines - thiomersal - is detrimental for vaccine stability (Harmsen et al., 2011a). Because nanobodies that are 146S specific are often also strain specific they must often be isolated again for novel strains. Note that novel FMDV strains emerge in the field and vaccine strains therefore need constant adjustment.

B) Use of nanobodies as medicine

For example a therapeutic objective is the use of nanobodies for protection of humans or animals against intoxication from toxins produced by snakes, scorpions (Hmila et al., 2010), spiders or bacteria (Hussack et al., 2011). Because such intoxication is often acute and deadly a treatment that confers immediate protection such as antibody application is required. Such therapeutic antibodies are often produced by immunisation of large animals such as horse, sheep or goats with inactivated toxins. Replacement of such therapeutic antibodies by a nanobody produced in microorganisms will eventually lead to reduced animal experimentation.

C) Use of nanobodies to purify medicines

Due to their high stability nanobodies can also be used for application in purification of biologicals by immunoaffinity chromatography (Verheesen et al., 2003). Here nanobodies are coupled to a column matrix and a crude product containing the biological of interest is led through the column. The biological is retained on the column due to binding by nanobody while the contaminants flow through the column. Then the binding of nanobody and biological is broken using a suitable buffer to elute the biological from the column. Using such Capture Select technology biologicals can be purified to a high level of purity that is difficult to obtain with other methods. It is especially used for the purification of biologicals produced by fermentation of animal cells for use in human therapeutic applications. Important biologicals that can be purified with nanobodies already are human antibodies and fragments thereof, albumin, growth hormone and follicle stimulating hormone.

The achievability of each objective is strongly dependent on the type of antigen. When the antigen is highly immunogenic it is highly probable (>95% chance) that antigen binding nanobodies will be isolated. For relatively facile applications such as R&D and QC of veterinary vaccines the availability of such nanobodies will probably result in usefull tests. However, when more rare specificities of the nanobody are required, such as specific binding to intact virions, the chance of achieving the objective is less likely. When using nanobodies for more complex therapeutic applications the requirements for the nanobody are

often more stringent resulting in a relatively lower chance of achieving the project objective. Note that the inability to isolate a suitable nanobody against a particular antigen to achieve a specific objective does not necessarily mean that a llama was immunized in vain since llamas are immunized with a cocktail of antigens that serve several objectives and this llama has most likely yielded good nanobodies against another antigen.

References:

Harmsen, M.M., Fijten, H.P., Westra, D.F., Coco-Martin, J.M., 2011a. Effect of thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles. *Vaccine* 29, 2682-2690.

Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlafar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Muyldermans, S., 2010. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *Faseb J* 24, 3479-3489.

Hussack, G., Arbabi-Ghahroudi, M., van Faassen, H., Songer, J.G., Ng, K.K., MacKenzie, R., Tanha, J., 2011. Neutralization of Clostridium difficile toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J. Biol. Chem.* 286, 8961-8976.

Verheesen, P., ten Haaf, M.R., Lindner, N., Verrips, C.T., de Haard, J.J., 2003. Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1624, 21-28.

3.3 Relevance

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

In general the novel nanobodies will result in improved diagnostics or therapy of diseases in animals or humans. Thus, it contributes to human and animal health. Human therapeutic applications are most likely cancer and inflammatory diseases. Animal therapeutic applications are most likely infectious diseases. An important objective of this project is to isolate nanobodies for purification of biologicals with Capture Select technology. This will lead to a higher degree of purification of such biologicals resulting in safer human therapy. Sometimes such biologicals exist in two isoforms which differ in therapeutic efficacy or levels of side effects. Purification of the most active isoform will lead to a more effective therapy or less side effects.

Due to their advantages nanobodies can be isolated that perform better than conventional antibodies for particular applications. Examples are:

- 1) Improvement of FMDV vaccines using nanobodies that discriminate intact and degraded FMDV virions (Harmsen et al., 2011a)
- 2) Improved tumor diagnostics using imaging techniques with nanobodies (De Meyer et al., 2014)
- 3) Improved or novel human therapy against various human diseases using nanobodies by the Belgian company [REDACTED]

References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* 32, 263-70.

Harmsen, M.M., Fijten, H.P., Westra, D.F., Coco-Martin, J.M., 2011a. Effect of thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles. *Vaccine* 29, 2682-2690.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

[REDACTED] is a service provider for llama immunization. Clients are primarily third parties and occasionally internal [REDACTED] projects. The client usually delivers the antigen. Occasionally [REDACTED] buys or makes the antigen. [REDACTED] discussed the llama immunization protocol with the client and informs the client that immunization of a llama with several antigens in parallel is advantageous both for the projects costs and to reduce animal use. [REDACTED] isolates sera and RNA from PBLs of each immunized llama for isolation of nanobodies either by the client or in [REDACTED] laboratories.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

A humoral immune response against the antigen of interest will be induced in a llama (Lama glama) by immunization. The llama will be immunized with several antigens in parallel to reduce animal use. As a rule of thumb we immunize with a maximum of ten antigens per llama. It is difficult to determine in advance how many antigens can be pooled for one llama immunization. This depends on several factors:

- 1) The immunogenicity of the antigen that is often known from immunizations in other mammals. Highly immunogenic antigens can be pooled more easily.
- 2) The requirements for the nanobody. For example a human therapeutic nanobody often has much more stringent requirements such as low immunogenicity in humans, safety, high potency than a nanobody for veterinary diagnostics.
- 3) The matrix effects of mixing antigens. For example a formalin inactivated toxin cannot be mixed with an antigen whose immunogenicity is destroyed by formalin.

Immunization can be done in several ways:

- 1) with a dead or inactivated antigen mixed with an adjuvant
- 2) by DNA immunization, often in combination with method 1). Here DNA immunization is used for priming immunization and dead antigen is used for one or two booster immunizations.
- 3) by vectored immunization. Here the antigen of interest is inserted into a virus or bacterium that shows limited replication in a llama without causing disease signs. During replication the antigen of interest is expressed in the llama. Examples of such an approach are immunization with Newcastle Disease Virus - vectored vaccines (Harmsen et al., 2011b) or with canarypox virus - vectored vaccines (Paoletti et al., 1994).

It is also possible that a llama is immunized by a combination of all three methods using three different antigens or antigen cocktails. During the immunization small samples of blood are collected for serum preparation. This can be used to monitor immune responses. After the llama has developed a sufficiently high antibody response against the antigen of interest a large blood sample is taken for isolation of peripheral blood lymphocytes (PBLs). This blood sample is larger than the serum samples to ensure that a diverse set of B-cells producing heavy-chain antibodies is isolated which is necessary to ensure nanobody library diversity. Two of such blood samples are collected at different moments during the immunisation procedure to ensure even more diverse nanobody libraries.

References:

Harmsen, M.M., Antonis, A., Moormann, R.J.M., Kortekaas, J., 2011b. Parenteral vaccination of mammalian livestock with Newcastle disease virus-based vector vaccines offers optimal efficacy and safety. *Bioengineered Bugs* 2, 1.
Paoletti, E., Tartaglia, J., Taylor, J., 1994. Safe and effective poxvirus vectors--NYVAC and ALVAC. *Dev Biol Stand* 82, 65-69.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The coherence between the llama immunizations is that they all serve the isolation of nanobodies. The experiments differ in the nature of the antigen. Different antigens are combined into a cocktail for llama immunization. [redacted] waits with llama immunization until several antigens, sometimes serving different objectives, can be simultaneously used for llama immunization. Llamas are preferably immunized consecutively, after a half year resting period, with another antigen cocktail. Two llamas are immunized with the same antigen cocktail since different llamas have very different antibody responses. Such immunization of two llamas is normally sufficient for retrieving nanobodies that are suitable for achieving the objective. It is difficult to determine in advance how many llamas are needed, especially since llamas are often immunized with cocktails of antigens. For example when llamas are immunized with ten antigens that are lowly immunogenic and which serve socially highly relevant human therapeutic objectives then even more than two llamas could be immunized.

We do not have a go-nogo between the different phases in llama immunization: the induction of an immune response and the collection of a large blood sample for isolation of RNA from PBLs, because:

1) The experience with llama immunization has shown that phage display selection is such a powerful selection methodology that one can even isolate good nanobodies from animals that do not (yet) show a good antibody response in serum. In other words: phage display selection is a more sensitive technology than simple ELISA.

2) Serum also contains conventional antibodies composed of both heavy and light chains which are not suitable for nanobody isolation. These antibodies interfere in the detection of the heavy-chain antibody response from which nanobodies are retrieved. Therefore additional methods are needed to separate conventional and heavy-chain antibodies.

3) It is highly impractical to collect an additional blood sample for serum preparation to predict antibody responses for future large blood sample collection since one then has to do a very rapid test within a few days. Furthermore, this also requires the collection of an additional blood sample. In our experience the collection of an additional blood sample is more discomforting to the llama than the collection of a single larger blood sample.

3.4.4 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	Immunization of llamas housed in a meadow for retrieving nanobodies
2	Immunization of llamas housed in contained stables for retrieving nanobodies
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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, see our website (www.zbo-ccd.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'.
40100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
1 Immunization of llamas housed in a meadow for retrieving nanobodies

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

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.

Llamas (Lama glama) will be immunized to induce an antibody response against a specific antigen. This is done using dead antigen formulated with an adjuvant or live cells formulated with or without adjuvant. One week after the penultimate and the last immunization a large blood sample will be collected for isolation of peripheral blood lymphocytes. These will form the source for cloning of the polyclonal nanobody repertoire into vectors suitable for subsequent

isolation of nanobodies that bind to specific antigens used for llama immunization. Most commonly these vectors are phagemids suitable for phage display selection.

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

The basic llama immunization procedure consists of three immunizations of a llama with a dead antigen, usually proteinaceous, formulated with an adjuvant. Immunizations are given with 3 to 4 week intervals. The first two immunizations are preferably given with the oil-emulsion adjuvant Specol (Stimune, Life Technologies), which is proven effective in llamas but gives side reactions such as itching and pain that can last for several days (Boersma et al., 1992). Post mortem inspection at [redacted] of llamas immunized with Specol has revealed encapsulated granuloma at injection sites. Immunizations are normally given intramuscularly, in a maximum volume of 5 ml per injection, that is given at two injection sites in the hind thigh. The third (last) immunization is preferably given with the adjuvant Montanide IMS1312 (Seppic) since this adjuvant gives less adverse reactions. Immunization is again intramuscularly in a maximum volume of 5 ml. The IMS1312 adjuvant is a watery adjuvant with less depot function than Specol. However, for the last immunization such a depot function is much less important since the last blood sample is collected a week later and any immune response thereafter is completely irrelevant. Preferably 100 microgram of protein is used per immunization. In exceptional cases, when the antigen to be used for llama immunization cannot be purchased separately and is only available in a commercial (adjuvanted) vaccines registered for veterinary use, we immunize with such vaccines.

A variant on immunization with dead antigens is immunization with live cells as antigen. This is often done to isolate nanobodies against membrane proteins. Such llama immunizations have been performed with tumour cells (Baral et al. 2011) or HEK293 cells expressing the antigen of interest (Jahnichen et al., 2010) and can be done with or without adjuvant.

In principle (to reduce the number of animals to be used) antigen cocktails are used for llama immunization. Cocktails can be made with as many as ten different antigens. In such cocktails, in theory antigenic competition can decrease the immune response against particular antigens. This is often described when evaluating mixtures of antigens that protect against different diseases. However, since the aim of the experiments is not to induce high antibody titres but rather to induce sufficiently high antibody titres for nanobody retrieval, we consider antigenic competition of less importance here. There are several literature examples of successful nanobody retrieval after immunization with cocktails (Conway et al., 2010; Harmsen et al., 2013).

Since the aim of the induction of antibody responses is to retrieve antigen specific nanobodies by molecular biological techniques there is no need to induce extremely high antibody titres. This is opposed to the use of vaccines for protection of the animal against disease, where higher antibody titres are often better for protection. However, for nanobody retrieval purposes, it is preferred to induce a sufficiently high immune response for successful isolation of a diverse set of nanobodies. When giving many booster immunizations to a llama one can sometimes reach higher antibody titres, but this often is accompanied by amplification of only a subset of the nanobodies that bind to only one epitope with high affinity. Such nanobodies could not be suitable for the project objective while other, more suitable, nanobodies have lower titres after the last boosters. In such a case the last boosters were detrimental to reach the project objective. Thus, it is better to aim for a diverse antibody response that is sufficiently high for monoclonal nanobody isolation using a limited number of immunizations. In [redacted] experience three conventional immunizations with proteinaceous antigens and adjuvant or four DNA immunizations are sufficient for this purpose.

One week after the last immunization and often also 1 week after the penultimate immunization a large blood sample will be collected for isolation of peripheral blood lymphocytes for subsequent nanobody retrieval. For this purpose the llamas are fixated (without sedation) and 150 ml heparinized blood is collected from the vena jugularis.

During the immunization procedure small samples of at most 20 ml blood are collected from the vena jugularis for preparation of serum that can be used to evaluate the immunization procedure by measuring antibody titres. Serum samples are never collected more than once weekly.

References:

Baral, T.N., Murad, Y., Nguyen, T.D., Iqbal, U., Zhang, J., 2011. Isolation of functional single domain antibody by whole cell immunization: implications for cancer treatment. *J Immunol Methods* 371, 70-80.

Boersma, W.J., Bogaerts, W.J., Bianchi, A.T., Claassen, E., 1992. Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with *Specol*. *Res. Immunol.* 143, 503-512.

Conway, J.O., Sherwood, L.J., Collazo, M.T., Garza, J.A., Hayhurst, A., 2010. Lama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptalex immunoreagents. *PLoS ONE* 5, e8818.

Harmsen, M.M., Blokker, J.C., Pritz-Verschuren, S.B., Bartelink, W., Van der Burg, H., Koch, G., 2013. Isolation of panels of llama single-domain antibody fragments binding all nine neuraminidase subtypes of influenza A virus. *Antibodies* 2, 168-192.

Jahnichen, S., Blanchetot, C., Maussang, D., Gonzalez-Pajuelo, M., Chow, K.Y., Bosch, L., De Vrieze, S., Serruys, B., Ulrichts, H., Vanderveide, W., Saunders, M., De Haard, H.J., Schols, D., Leurs, R., Vanlandschoot, P., Verrips, T., Smit, M.J., 2010. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 20565-20570.

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

No statistical methods are used since this is not necessary. Two llamas are immunized with each antigen or mixture of antigens. Since llamas are outbred animals the diversity of the immune response is much higher when using different animals. More than 2 llamas are normally not needed (empirical evidence). Llamas are immunized with several different antigens, serving different purposes, in parallel (see previous section). This is an important way to minimise the number of animals.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Llamas (L. glama) are used since the methods for nanobody retrieval are well described for this species (Van der Linden et al., 2000). Llamas of at least one year old are used, since these have a sufficiently mature immune system and sufficient body weight (more than 50 kg) to assure that the blood samples taken do not cause anemia. Llamas are always housed in groups of at least two to prevent social stress. Groups of llamas are always of the same gender. Female llamas are used, since these are more amenable to handling by biotechnicians. In [redacted] 20-years of experience female llamas react with less stress when fixated for immunization or blood collection. Non-pregnant female llamas are purchased from a conventional llama supplier in The Netherlands since there are no registered llama suppliers in the Netherlands.

[redacted] is currently housing a group of six female llamas that are to be (re-)used for llama immunization. In addition to this group of six llamas, which we consider part of earlier llama immunizations, we intend to immunize a total of 20 llamas in a 5-year period.

References:

Van der Linden, R., De Geus, B., Stok, W., Bos, W., Van Wassenaer, D., Verrips, T., Frenken, L., 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods* 240, 185-195.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Llamas that are re-used will get a 6 month rest period between successive immunization cycles. Re-use is done for a maximum of four immunization cycles, where each cycle consists of a series of immunizations with 3-4 week intervals.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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: Nanobodies can only be retrieved from camelids and llamas are a suitable species for nanobody retrieval due to their relative ease of handling and well described procedures for nanobody retrieval. Good (potent, high-affinity, stable, specific) nanobodies are best retrieved from llamas immunized with the antigen of interest. In principle it is possible to retrieve antigen binding nanobodies from non-immunized animals. This is accomplished by isolating PBLs from many (>10) llamas and creating very large nanobody phage display libraries from these PBLs, resulting in so-called naïve libraries. Sometimes, further diversity can be introduced in such libraries by molecular biological techniques, resulting in synthetic naïve libraries. In general the antigen binding nanobodies isolated from such libraries are of lesser quality (potency, affinity, stability, specificity) than those isolated from immune libraries. For this reason, such approaches are only used for antigens that can not be used for immunization because they are not immunogenic or too toxic (De Meyer et al. 2014). If feasible, nanobodies are therefore preferentially retrieved by immunization of camelids.

Nurse sharks also produce a special class of single-domain antibodies that have been termed IgNAR. These, however, have a vestigial complementarity determining region 2, resulting in less diversity of antibody responses as compared to nanobodies (Stanfield et al., 2004). Also because of the difficulty in handling sharks for immunization and the higher immunogenicity of IgNAR domains upon human therapeutic use, camelids are preferred over sharks for isolation of single-domain antibodies.

Reduction: An important way to reduce animal use is to immunize llamas with multiple antigens serving different purposes in parallel, and to do repeated immunizations of llamas with novel antigen cocktails after a half-year resting period.

Refinement: In the last immunization [redacted] uses an adjuvant that gives less severe side reactions - Montanide IMS1312 - to reduce the secondary inflammatory reactions that are sometimes induced by the adjuvant Specol, that is used for the first two immunizations.

References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol 32, 263-270.
Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. Science 305, 1770-1773.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Llamas are getting a rest period of two weeks after transport to [redacted] to get accustomed to the new environment and the biotechnicians before they are immunized. The biotechnicians will regularly (once a week) contact the llamas to reduce stress upon future llama handlings. Female llamas are used since these show lower stress symptoms upon llama handling.

[redacted] uses an adjuvant that gives less severe side reactions - Montanide IMS1312 - for the last immunization to reduce the secondary inflammatory reactions that are sometimes induced by the adjuvant Specol, that is used for the first two immunizations. The first two immunizations are done with Specol since this adjuvant has a stronger depot effect and is proven effective in llamas. Specol can induce severe secondary inflammatory reactions. However, the long experience at the [redacted] with Specol-adjuvanted llama immunizations suggests that the level of discomfort is less severe than described in the code of practice.

This could be due to the fact that the code of practice is developed for laboratory animals and not for large farm animals. The llamas are killed at the end of the last experiment since they still contain antigens used for llama immunization at the injection sites. Since llamas are occasionally used for human consumption such a precaution is necessary to prevent intoxication of humans with antigens used for immunization.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is. In most instances llamas have never been immunized with the antigen of interest earlier and good nanobodies are not available against the target antigen. An advantage of llama immunization is that phage display libraries can be stored in the lab for future nanobody retrieval. Thus, when novel nanobodies are required for a particular project and a phage display library of a llama that was immunized with a highly related antigen is available then a novel llama immunization is not necessary. Such is the case for example when isolating nanobodies against a novel strain of influenza or foot-and-mouth disease virus, for which libraries derived from llamas immunized with different strains of the same serotype exist. Often conventional monoclonal antibodies already exist against the target antigen. However, for many applications, especially therapeutic applications, nanobodies offer many advantages over conventional monoclonal antibodies (see Project proposal) to justify nanobody isolation.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

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.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

The intramuscular injection of vaccine and blood sampling from the jugular vein with a needle induces a short pain that does not require pain relieving methods. The immunization with Specol adjuvant can result in adverse secondary reactions that can include pain. Experience at the [redacted] with Specol-adjuvanted llama immunizations suggests that the level of discomfort is less severe than described in the code of practice, and that giving painkillers is not perse necessary.

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The immunization with Specol adjuvant will result in adverse inflammatory reactions that can, beside pain, include itching, encapsulated granuloma and reduced appetite, that can last for several days. A total of about 380 ml blood will be collected in a 2 month period. The llamas used (at least 1-year-old) have sufficient body weight and circulating blood volume to cope with such blood sampling without developing anemia. When llamas are housed in a meadow it is possible that unforeseen diseases may develop.

Explain why these effects may emerge.

Due to housing of llamas in the field they can develop any disease that is occurring in the environment.

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

A veterinarian will be consulted when animals show signs of disease and a proper treatment plan will be adopted.

J. 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 K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The repeated immunization with Specol adjuvant is expected to cause most discomfort to the llamas. Specol can induce severe secondary inflammatory reactions. However, the long experience at [redacted] with Specol-adjuvanted llama immunizations suggests that the level of discomfort is less severe than described in the code of practice. This could be due to the fact that the code of practice is developed for laboratory animals and not for large farm animals. The overall level of discomfort is estimated as moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

The llamas are killed at the end of the experiment since they still contain antigens used for llama immunization at the injection sites. Since llamas are occasionally used for human consumption such a precaution is necessary to prevent intoxication of humans with antigens used for immunization. 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

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, see our website (www.zbo-ccd.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

40100

Stichting Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Serial number

2

Type of animal procedure

Immunization of llamas housed in contained stables for retrieving nanobodies

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

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.

Llamas (Lama glama) will be immunized to induce an antibody response against a specific antigen. This is done using either DNA immunisation or using a genetically modified virus or bacterium that expresses a gene encoding the antigen of interest. One week after the penultimate and the last immunization a large blood sample will be collected for isolation of peripheral blood lymphocytes. These will form the source for cloning of the polyclonal nanobody repertoire

into vectors suitable for subsequent isolation of nanobodies that bind to specific antigens used for llama immunization. Most commonly these vectors are phagemids suitable for phage display selection.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach. The basic llama immunization procedure described here is immunization with DNA or with genetically modified microorganisms that express the antigen of interest.

Llamas are immunized by DNA immunization using plasmids commonly used for DNA immunization of mammals, such as pVR1012-derived plasmids. These encode the gene of interest controlled by the human CMV promoter/enhancer region and the bovine growth hormone polyadenylation signal. DNA immunization is done by administering 50 microgram of plasmid in 1 ml Tris-EDTA buffer intramuscularly into the neck at four spots (i.e. 0.25 ml per spot). DNA immunization is normally less effective in inducing high antibody titres, but has the advantage of being highly specific for the antigen encoded by the plasmid. DNA immunization is therefore sometimes combined with booster immunizations with proteinaceous antigens with adjuvant, which is described in animal procedure with serial number 1.

Immunization with vectored vaccines will be done with Newcastle Disease Virus (NDV) - vectored vaccines derived from the lentogenic LaSota strain (Harmsen et al., 2011) or with canarypox (ALVAC) virus (Paoletti et al., 1994). These vectors are proven effective in mammals and do not cause clinical disease signs in mammals. Both vectors do not spread in mammals and can only give some local limited replication. NDV vector vaccines are given intramuscularly in a volume of at most 5 ml without adjuvant. ALVAC vectors are given intramuscularly in a volume of at most 5 ml with Carbopol adjuvant. For llama immunization antigen cocktails are used. This can be done with as many as ten different antigens. In theory antigenic competition can decrease the immune response against particular antigens. This is often described when evaluating mixtures of antigens that protect against different diseases. However, since the aim of our experiments is not to induce high antibody titres but rather to induce sufficiently high antibody titres for nanobody retrieval, we consider antigenic competition of less importance here. There are several literature examples of successful nanobody retrieval after immunization with cocktails of proteinaceous antigens with adjuvant (Conway et al., 2010; Harmsen et al., 2013).

Since the aim of the induction of antibody responses is to retrieve antigen specific nanobodies by molecular biological techniques there is no need to induce extremely high antibody titres. This is opposed to the use of vaccines for protection of the animal against disease, where higher antibody titres are often better for protection. However, for nanobody retrieval purposes, we prefer to induce a sufficiently high immune response for successful isolation of a diverse set of nanobodies. When giving many booster immunizations to a llama one can sometimes reach higher antibody titres, but this often is accompanied by amplification of only a subset of the nanobodies that bind to only one epitope with high affinity. Such nanobodies could not be suitable for the project objective while other, more suitable, nanobodies have lower titres after the last boosters. In such a case the last boosters were detrimental to reach the project objective. Thus, we aim for a diverse antibody response that is sufficiently high for monoclonal nanobody isolation using a limited number of immunizations. In our experience three immunizations with NDV or ALVAC-vectored vaccines or four DNA immunizations are sufficient for this purpose. One week after the last immunization and often also 1 week after the penultimate immunization a large blood sample will be collected for isolation of peripheral blood lymphocytes for subsequent nanobody retrieval. For this purpose the llamas are fixated and 150 ml heparinized blood is collected from the vena jugularis without sedation.

During the immunization procedure small samples of at most 20 ml blood are collected from the vena jugularis for preparation of serum that can be used to evaluate the immunization procedure by measuring antibody titres. Serum samples are never collected more than once weekly.

References:

- De Meyer, T., Muylldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol 32, 263-270.
Conway, J.O., Sherwood, L.J., Collazo, M.T., Garza, J.A., Hayhurst, A., 2010. Llamma single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptalex immunoreagents. PLoS ONE 5, e8818.
Harmsen, M.M., Antonis, A., Moormann, R.J.M., Kortekaas, J., 2011. Parenteral vaccination of mammalian livestock with Newcastle disease virus-based vector

vaccines offers optimal efficacy and safety. Bioengineered Bugs 2, 1.
Harmsen, M.M., Blokker, J.C., Pritz-Verschuren, S.B., Bartelink, W., Van der Burg, H., Koch, G., 2013. Isolation of panels of llama single-domain antibody fragments binding all nine neuraminidase subtypes of influenza A virus. Antibodies 2, 168-192.
Paoletti, E., Tartaglia, J., Taylor, J., 1994. Safe and effective poxvirus vectors--NYVAC and ALVAC. Dev Biol Stand 82, 65-69.

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

No statistical methods are used since this is not necessary. Two llamas are immunized with each antigen or mixture of antigens. Since llamas are outbred animals the diversity of the immune response is much higher when using different animals. Llamas are immunized with several different antigens, serving different purposes, in parallel (see previous section). This is an important way to minimise the number of animals.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Llamas (*L. glama*) are used since the methods for nanobody retrieval are well described for this species (Van der Linden et al., 2000). Llamas of at least one year old are used, since these have a sufficiently mature immune system and sufficient body weight (more than 50 kg) to assure that the blood samples taken do not cause anemia. Llamas are always housed in groups of at least two to prevent social stress. Groups of llamas are always of the same gender. Female llamas are used, since these are more amenable to handling by biotechnicians. In 20-years of experience female llamas react with less stress when fixated for immunization or blood collection. Non-pregnant female llamas are purchased from a conventional llama supplier in The Netherlands since there are no registered llama suppliers in the Netherlands.
We intend to immunize a total of 4 llamas in a 5-year period.

References:

Van der Linden, R., De Geus, B., Stok, W., Bos, W., Van Wassenaar, D., Verrips, T., Frenken, L., 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. J. Immunol. Methods 240, 185-195.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. 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: Nanobodies can only be retrieved from camels and llamas are a suitable species for nanobody retrieval due to their relative ease of handling and well described procedures for nanobody retrieval. Good (potent, high-affinity, stable, specific) nanobodies are best retrieved from llamas immunized with

the antigen of interest. In principle it is possible to retrieve antigen binding nanobodies from non-immunized animals. This is accomplished by isolating PBLs from many (>10) llamas and creating very large nanobody phage display libraries from these PBLs, resulting in so-called naïve libraries. Sometimes, further diversity can be introduced in such libraries by molecular biological techniques, resulting in synthetic naïve libraries. In general the antigen binding nanobodies isolated from such libraries are of lesser quality (potency, affinity, stability, specificity) than those isolated from immune libraries. For this reason, such approaches are only used for antigens that can not be used for immunization because they are not immunogenic or too toxic (De Meyer et al. 2014). If feasible, nanobodies are therefore preferentially retrieved by immunization of camelids.

Nurse sharks also produce a special class of single-domain antibodies that have been termed IgNAR. These, however, have a vestigial complementarity determining region 2, resulting in less diversity of antibody responses as compared to nanobodies (Stanfield et al., 2004). Also because of the difficulty in handling sharks for immunization and the higher immunogenicity of IgNAR domains upon human therapeutic use, camelids are preferred over sharks for isolation of single-domain antibodies.

Reduction: An important way to reduce animal use is to immunize llamas with multiple antigens serving different purposes in parallel.

References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol 32, 263-270.
Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. Science 305, 1770-1773.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Llamas are getting a rest period of two weeks after transport to [redacted] to get accustomed to the new environment and the biotechnicians before they are immunized. The biotechnicians will regularly (once a week) contact the llamas to reduce stress upon future llama handlings. Female llamas are used since these show lower stress symptoms upon llama handling.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is often conventional monoclonal antibodies already exist against the target antigen. However, for many applications, especially therapeutic applications, nanobodies offer many advantages over conventional monoclonal antibodies (see Projectvoorstel) to justify nanobody isolation.

In most instances llamas have never been immunized with the antigen of interest earlier and good nanobodies are not available against the target antigen. An advantage of llama immunization is that phage display libraries can be stored in the lab for future nanobody retrieval. Thus, when novel nanobodies are required for a particular project and a phage display library of a llama that was immunized with a highly related antigen is available then a novel llama immunization is not necessary. Such is the case for example when isolating nanobodies against a novel strain of influenza or foot-and-mouth disease virus, for which libraries derived from llamas immunized with different strains of the same serotype exist.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

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.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

The intramuscular injection of vaccine and blood sampling from the jugular vein with a needle induces a short pain that does not require pain relieving methods. The immunization with Carbopol adjuvant can induce pain.

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The llamas are housed in contained facilities since they are immunized with plasmids or genetically modified organisms. The immunization with Carbopol adjuvant will result in adverse reactions: itching, pain and reduced appetite, that can last for several days. However, the effects of this adjuvant are not as severe as with oil emulsion adjuvant. A total of about 380 ml blood will be collected in a 2 month period. The llamas used (at least 1-year-old) have sufficient body weight and circulating blood volume to cope with such blood sampling without developing anaemia.

Explain why these effects may emerge.

According to GMO regulation llamas must be housed in contained facilities to prevent spread of genetically modified organisms into the environment.

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

Llamas receive adequate housing facilities.

J. 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 K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The llamas are housed in contained facilities. As a result they have limited ability to walk around and cannot graze. Sometimes an adjuvant is used in vectored-immunization, which does not give as severe side reactions as oil-emulsion adjuvants. The overall level of discomfort is estimated as moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

The llamas are killed at the end of the experiment since they cannot be introduced into the environment after immunization to prevent spread of genetically modified organisms into the environment.

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



[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Dierexperimenten
Commissie DLO

DATUM
3 maart 2015

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD40100201545

UW KENMERK
AVD40100201545

POSTADRES
[REDACTED]

BEZOEKADRES
[REDACTED]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

CONTACTPERSOON
[REDACTED]

TELEFOON
[REDACTED]

E-MAIL
[REDACTED]

Geachte heer, mevrouw,

Onderstaand het advies van de DEC aangaande het project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)",

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD40100201545**
2. Titel van het project: Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)
3. Titel van de NTS: Opwekken van een antigeen-specifieke immuunrespons in lama's om specifieke afweerstoffen te isoleren tegen antigenen
- 4.
5. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
6. Contactgegevens DEC:
DEC-DLO
[REDACTED]
Secretaris: [REDACTED]
7. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 19-02-2015
In vergadering besproken : 20-02-2015
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 23-02-2015
Strekking van de vragen:
 - De DEC heeft een aantal suggesties gedaan voor tekstuele verbeteringen
 - De DEC heeft vragen gesteld over:
 - o de begrenzing van het doel van het project
 - o het maximum aantal keren dat een dier hergebruikt kan worden
 - o het mogelijke gebruik van pijnstillers
 - o ongerief door reactie op de immunisatiesDatum antwoorden: 24-02-2015
Strekking van de antwoorden:
 - Er zijn tekstuele wijzigingen doorgevoerd
 - op vragen van de DEC:
 - o het doel van het project is beter afgebakend
 - o op proefplan niveau zal uitgewerkt worden of het mogelijk is om het aantal keren hergebruik te vergroten zonder dat het

- ongerief van de dieren substantieel toeneemt, maar waardoor het aantal te gebruiken dieren kan afnemen
- o op proefplanniveau zal het gebruik van pijnstillers uitgewerkt worden
 - o ongerief door reactie op de immunisaties is verduidelijkt.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt en vanuit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het reële belang van het project, te weten het verkrijgen van een specifiek type antilichamen (nanobodies) voor humane en veterinaire diagnostiek of therapie, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. De proeven kunnen alleen uitgevoerd worden met lama's en die kunnen niet van een geregistreerde instelling worden betrokken. Bij een deel van de proeven (indien er gewerkt wordt met GGO's) moeten de dieren achter een barrière gehulsvest worden en is hergebruik niet mogelijk. Het gebruik van GGO's als vector is soms onderdeel van de ontwikkeling van vaccins. Er kan in sommige experimenten sprake zijn van hergebruik onder bepaalde voorwaarden. Ook zal gekeken worden of pijnbestrijding toegepast kan worden om tot verdere verfijning te komen.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit hanteren, inspuiten, reactie op de immunisatie en bloedafname. Bij een deel van de proeven (indien er gewerkt wordt met GGO's) kunnen de dieren niet op conventionele wijze gehulsvest worden. Om in het welzijn van de dieren tegemoet te komen wordt in de dierverblijven kooiverrijking aangeboden en wordt er naar gestreefd eventuele stress te verminderen door de dieren vertrouwd te maken met de dierverzorgers.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Synthetisch vervaardigde nanobodies geven veel minder bruikbare resultaten.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Er ligt geen statistische onderbouwing ten grondslag aan het aantal van twee dieren per experiment. Omdat uit ervaring is gebleken dat 1 dier vaak onvoldoende is voor een gewenste diversiteit in de immunreactie moet een experiment met 2 dieren uitgevoerd worden en meer dieren blijkt niet nodig. Het aantal dieren voor het gehele project is realistisch ingeschat op basis van ervaringen in het verleden en de te verwachten vraag van opdrachtgevers. De DEC heeft de onderzoeker meegegeven om te onderzoeken of hergebruik van dieren meer dan 3 keer in bepaalde gevallen wetenschappelijk en vanuit welzijns oogpunt acceptabel is. Dit zou kunnen leiden tot een verdere vermindering van het aantal proefdieren. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.

9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Het dierenwelzijn wordt geborgd door dieren te hulsvesten op een wijze die zo veel mogelijk tegemoet komt aan de natuurlijke behoeften van de dieren en door kooi- en plaatsing in een weide niet toegestaan is. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
De DEC heeft de onderzoeker gevraagd om te bestuderen of het gebruik van pijnstilling een verdere vermindering van het ongerief zou kunnen opleveren. Er is geen sprake van belangwekkende milieu effecten.
10. 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.

DATUM
3 maart 2015

PAGINA
3 van 3

D. Ethische afweging

- De DEC is unaniem van mening dat het doel van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van humane en veterinaire medicijnen en diagnostische testen. Voor dit project zijn geen alternatieven beschikbaar. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

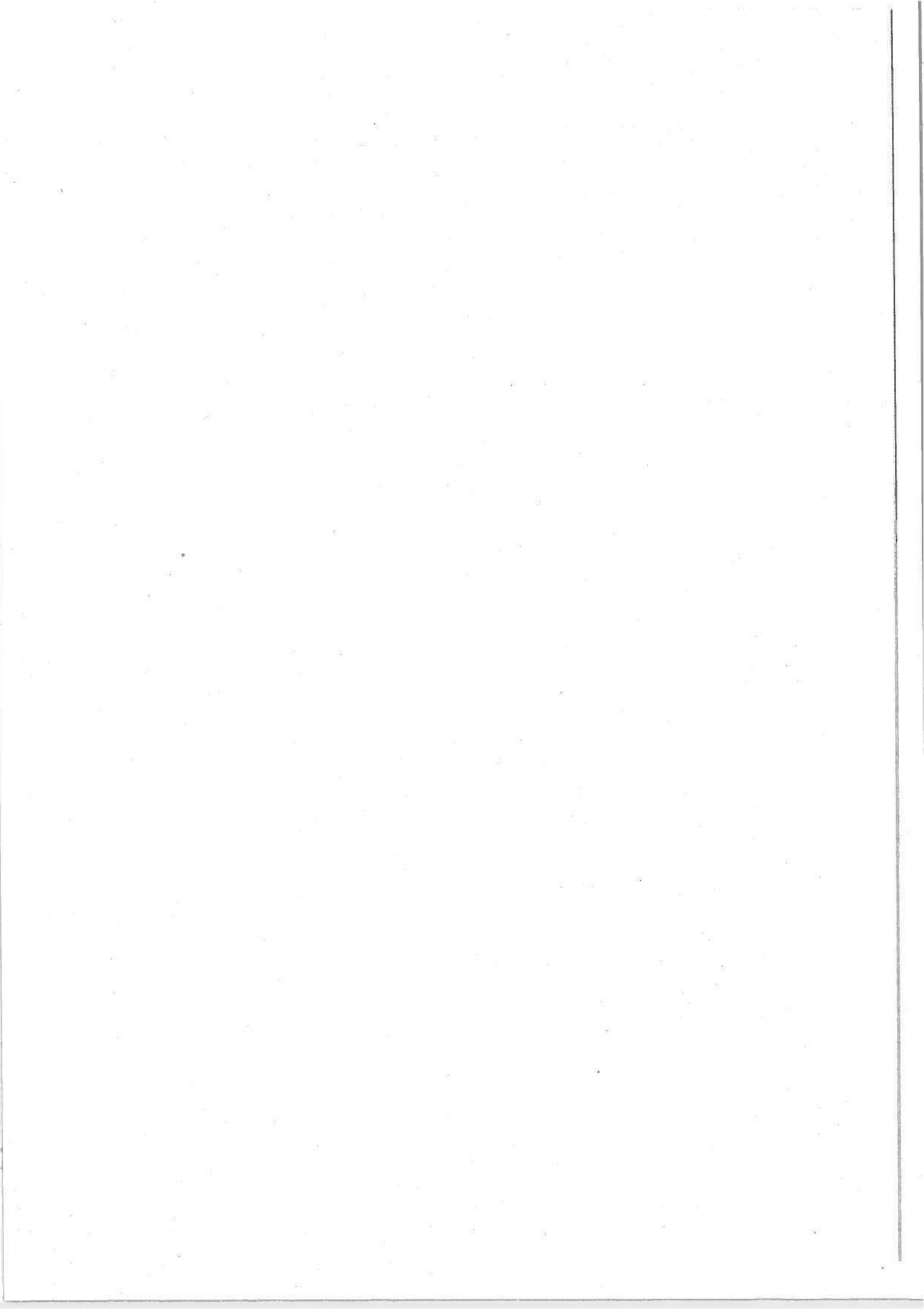
E. Advies

De DEC adviseert unaniem om de vergunning te verlenen.

Met vriendelijke groet



secretaris DEC





Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO
t.a.v. [REDACTED]
Akkermaaisbos 59
6700 AW Wageningen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD40100201545

Datum 13 april 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 13 maart 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)" met aanvraagnummer AVD40100201545. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed, onder de in de vergunning opgenomen voorwaarden, op grond van artikel 10a, lid 3, van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 april 2015 tot en met 1 april 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-DLO gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige

Datum
13 april 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD40100201545

voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Het Bestuur van de Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals het bestuur van de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- Projectvoorstel
 - Niet-technische samenvatting
 - DEC-advies

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Stichting DLO
Adres: Akkermaalsbos 59
Postcode en woonplaats: 6700 AW Wageningen
Deelnemersnummer: AVD40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 april 2015 tot en met 1 april 2020 voor het project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)" met aanvraagnummer AVD40100201545, volgens advies van Dierenexperimentencommissie DEC-DLO.

De verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk medewerker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 maart 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij brief op 13 maart 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij brief op 13 maart 2015.
 - c. Advies van dierenexperimentencommissie d.d. 3 maart 2015 ontvangen op 13 maart 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Immunization of llamas housed in a meadow for retrieving nanobodies	Lama (Lama glama)	16	Matig	De humane eindpunten moeten worden vastgelegd in overleg met de Instantie voor Dierenwelzijn voordat het project gestart wordt.
Immunization of llamas housed in contained stables for retrieving nanobodies	Lama (Lama glama)	4	Matig	De humane eindpunten moeten worden vastgelegd in overleg met de Instantie voor Dierenwelzijn voordat het project gestart wordt.

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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

Datum
13 april 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD40100201545

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 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 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 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 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 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.