

## Konferensrapport 1st Nordic zebrafish and medaka care workshop, 7 februari 2018, Oslo

Denna nordiska zebrafisk-workshop arrangerades av Norges miljö- och biovetenskapliga universitet, Oslo universitet och Scanbur. Syftet med mötet var att fortsätta en kontinuerlig dialog och utbildning i frågan om hur forskningsgemenskapen kan säkerställa en hög kvalitet av djuromsorg och välfärd inom vetenskapen. Mötet var en uppföljning på det nordiska zebrafiskmötet som hölls i Uppsala 14-15 September 2017, där idén föddes att starta en serie av nordiska zebrafisk husbandry & care workshops för att etablera ett nätverk bland forskare som använder zebrafisk inom sin forskning.

Dagen bestod av föreläsningar om utfodring, hållning, hälsoövervakning och avlivning av zebrafisk samt 3R-aspekter i användningen. Några laboratorier som använder zebrafisk presenterade sin verksamhet. Dagen avslutades med en gemensam diskussion om angelägna frågor samt ett besök på miljö- och biovetenskapliga universitetets zebrafiskanläggning.

Drygt 50 personer från forskning, zebrafiskföreningar, myndigheter och 3R-center deltog. Från det svenska 3R-centret deltog Karen Erlbacher.

### Sammanfattning

Dagen inleddes med en presentation av Ana Catarina Certal, president i zebrafiskhållningsföreningen (Zebrafish Husbandry Association) i Lissabon. Hon presenterade framgångar i uppfödning av zebrafisk med hjälp av förbättrade foderprogram. Hon berättade att de med hjälp av en förbättrad utfodring kunde öka embryons överlevnad avsevärt under de första 24-48 timmarna. Föreningen använder en täthet på 10 fiskar per liter i sina akvarier.

Marianne Kraugerud från Fiskveterinärgruppen i Oslo berättade att det är viktigt att ha en bra hälsoövervakning för forskningens kvalitet, subkliniska påverkan och även risk för zoonoser. Hälsoövervakningen behöver anpassas efter verksamheten och det finns riktlinjer (Aquatic Animal Health Code) från Världsorganisationen för djurhälsa (OIE - <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-code/access-online/>) om lämpligt antal prover som behövs för att kunna utesluta en sjukdom med en stor säkerhet. Beroende på vad som ska övervakas behövs olika strategier som delvis kan genomföras i miljön, på levande fisk och delvis på fisk som avlivas för undersökning. Bortsett från olika sjukdomar finns även störningar i utfodringen som kan ställa till problem. Hon pratade om symptom och relevanta provtagningsmetoder.

Adrian Smith från Norecopa, Norges 3R-center, presenterade deras verksamhet och mängden av information om zebrafisk som finns på Norecopas webbplats (<https://norecopa.no/fish/zebrafish>). Adrian förklarade att Norecopa är en del av den europeiska konsensus-plattformen Ecopa (European consensus-platform for alternatives). Ecopa har till syfte att främja de 3R:n (Replacement, Reduction and Refinement) vid användning av djur i forskning, testning, undervisning och träning. Ecopa och Norecopa sträver efter konsensus mellan alla fyra intressentgrupper för att nå fram med de 3 R:n. Intressenterna är regering och regulatoriska myndigheter, akademi, industri samt djurskyddsorganisationer vilket återspeglas i sammansättningen av Norecopas styrelse. Adrian hänvisade att, utöver de 3R:n, även de tre S:n – good science, good sense och good sensibilities – som tillskrivs Carol M. Newton borde beaktas inom användning av djur för forskning, testning och undervisning. Norecopa tillhandahåller information om bland annat hållande, anestesi och avlivning, handling, provtagning samt välfärdsövervakning av zebrafisk.

Peter Alestrom från Norges miljö- och biovetenskapliga universitet och ordförande av FELASA:s (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) joint working group on zebrafish guidelines informerade om arbetet med dessa riktlinjer. På grund av zebrafiskens reproduktionssätt och embryonas genomskinlighet har zebrafisken under de senaste åren blivit allt vanligare som djurmodell inom forskningen. Zebrafisk ses som en möjlighet att ersätta användning av däggdjur som mus och råttor med djur som allmänt ses ha mindre förmåga att uppleva smärta och lidande. Arbetsgruppen har som uppdrag att se över tillgänglig information och ta fram riktlinjer för hållande och skötsel som främjar djurens hälsa och välbefinnande. Riktlinjerna kommer omfatta zebrafiskens biologi, transport, mottagning, introduktion i anläggningar, hållandesystem, miljöförhållanden (vattenkvalité), utrustning, utfodring, uppfödning, märkning, nomenklatur, anestesi /smärtlindring och eutanasi. Gruppen ska särskilt ta hänsyn till hållandemiljön, skötselåtgärder, veterinär vård och försöksprocedurer. Riktlinjerna ska även ge information om hälsoövervakningsprogram. Peter anser att zebrafisk som djurmodell ger möjlighet till alla 3R, genom ersättning för däggdjur, minskad användning genom kryopreservation och utnyttjande av embryon samt förfining genom optimerade och standardiserade förhållanden för djuren. Arbetsgruppen har funnit att djurtätheten i akvarier i olika laboratorier varierade mellan 5-12 djur per liter och med 5-7 djur per liter som vanligast. Angående frågan när zebrafiskyngel själva kan inta foder och således faller under försöksdjursdirektivet (2010/63/EU) angav Peter att 50 % av ynglen kan jaga och äta själva 120h efter befruktningen, alltså ungefär efter 6 dagar, med viss variation beroende på temperatur. Riktlinjerna förväntas bli klara under året.

Gunvor Knudsen från Mattilsynet, Norges myndighet för livsmedelssäkerhet, gav en överblick över Norges myndighetsstruktur i samband med djurförsök samt hur myndigheten arbetar med att bevaka de 3R:en vid användning av fisk för forskningsändamål. I Norge är det Mattilsynet som bedömer, godkänner och kontrollerar djurförsök. Dess uppgift är att säkerställa att djurförsöken genomförs på ett acceptabelt sätt från djurvälståndssynpunkt. Mattilsynet samlar även in försöksdjursstatistik, ger råd i försöksdjursfrågor och gör utvärderingen av försök i efterhand. Stortinget i Norge behandlar just nu frågan om det ska inrättas en nationell kommitté för skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål som krävs enligt försöksdjursdirektivet.

Gunvor berättade att Mattilsynet under ansökningsförfarandet för godkännande av djurförsök strävar efter en standardisering för hållande och skötsel av djuren samt användning av bedömningsmallar (score sheets) och humana slutpunkter. En utmaning är dock att det delvis saknas tillräckligt kunskap om bra hållande för just zebrafisk särskilt med hänsyn till lämplig miljöberikning. Ofta diskuteras foder, vattenkvalité, plantor eller bilder på plantor, användning av glaskulor eller galler. Brister som ses i ansökningar är försöksupplägget, beräkning av antalet djur, beskrivning av procedurer djuren ska utsättas för och humana slutpunkter.

En föreläsare från Norges miljö- och biovetenskapliga universitet berättade om hållande och skötsel av medaka (japansk risfisk), en annan tropisk fiskart som ursprungligen kommer från Japan. Han förde fram att medaka i många avseenden är ganska lik zebrafisk men skiljer sig på vissa punkter från den. Medaka är närmare släkt med lax och torsk och lämpar sig därför för försök som syftar till dessa kommersiella fiskarter.

Det finns en mängd stammar och en del molekylär teknik är framtagen. Djuren är bra lämpade för embryonal forskning eftersom de har en kort generationstid (8-12 veckor) samt att ägg och embryon är genomskinliga. Äggen är enkla att samla från honan eftersom de är lätta att se och stabila. Medaka är en bra modell för reproduktionsfysiologi och beteendestudier eftersom dominant hanar avskärmar honan från andra hanar och visar en utpräglad benägenhet att slåss. Medaka tål ganska salt vatten och stora temperaturskillnader (4-40 °C).

Kristine van Krogh, veterinär på Norges miljö- och biovetenskapliga universitet, presenterade synpunkter på djurskyddsmässigt acceptabla avlivningsmetoder för zebrafisk. Enligt henne ska en djurvänlig avlivningsmetod leda till döden utan något tecken på panik, smärta eller lidande, ska leda till medvetslöshet så fort som möjligt, ska vara tillförlitlig, reproducerbar och irreversibel. För den som utför avlivningen ska den dessutom vara lätt att hantera, säker, inte otrevlig och ha ingen eller liten miljöpåverkan. Bilaga IV i direktivet 2010/63/EU tillåter bara tre avlivningsmetoder för fisk, nämligen kraftigt slag mot huvudet, elstöt samt anestetisk överdos. Slag mot huvudet är inget bra alternativ för små fiskar eftersom det förstör hela fisken, elektrisk stöt kräver specialiserad utrustning och de vanligast använda bedövningsmedlen (Tricain MS 222, Benzocain och kryddnejlikaolja) tar ganska lång tid (upp till 20 sekunder), är toxiska och kan ha påverkan på försöket. Det har beskrivits en del aversiva reaktioner hos fisk vid avlivning med dessa.

Kristine har undersökt en annan metod som använts för immobilisering av fisk, nämligen nedkylning (hypotermi) genom gradvis nedkylning av vattnet. En vidareutveckling av detta är snabb nedkylning i isvatten (hypotermisk chock). Denna metod är snabb (omkring 1 sekund) och fungerar utmärkt för vuxna zebrafiskar. Återhämtning sker sällan om man lämnar djuren i isvattnet i några sekunder. Metoden är enkel att hantera och har ingen miljöpåverkan.

För yngel tar det mycket längre tid (10-20 min), och hon gjorde försök med att kombinera det med blekning vilket ledde till att 100% av djuren dog, MS 222 resulterar bara i att 60 % av djuren dör. Eftersom metoden inte finns med i bilagan i direktivet fördes en diskussion om metoden har godkänts av några medlemsstater. Metoden har bland annat godkänts i Norge och i Irland. I Sverige behöver en ansökan om godkännande av en avlivningsmetod som inte finns med i direktivet av andra än vetenskapliga skäl göras hos Jordbruksverket.

Därefter presenterade några forskare och organisationer sin verksamhet och vilken nytta den kan ge. De presenterade en databas för zebrafisk-management, en stor Core-facilitet, hållningssystem för zebrafisk och ett konsortium för genetiskt modifierade organismer.

Dagen avslutades med en gemensam diskussion av några frågor som lyfts från deltagarna. Punkterna som diskuterades var transport av zebrafisk, miljöberikning och positiv välfärd. Många upplever ett problem med att djur dör under transport, antingen på grund av dåliga transportförhållanden eller att djuren inte blir insläppta i landet och dör i tullen. För vissa är det oklart när embryon räknas som djur eller som biologisk material i samband med transport. Det önskades en gemensam ståndpunkt inom EU.

Angående miljöberikning berättade några användare att det bildas en biofilm på plantor av plast vilket innebär en smittorisk. Några rapporterade att de kunde observera att djuren skadar sig på plastplantor. Andra rapporterade däremot att de genom tvättning av tankarna med ättiksyra och en lägre djurtäthet kunde minska tillväxten av biofilm men att tankarna inte kunde hållas helt sterila. Det önskades specifika zebrafiskkurser för försöksdjursveterinärerna.

Frågan om ny kunskap inom positiv välfärd för zebrafiskar ansågs svårbesvarad eftersom det är svårt att undersöka om fiskarna är glada eller inte. Vissa upplevde sina fiskar som lyckliga och kunde inte visa på någon skillnad i tillväxt eller beteende hos fiskar fångade i naturen mot djur uppfödda i fångenskap. Andra påpekade att det finns forskning som visar att zebrafiskar med miljöberikning har en bättre hjärnutveckling än fiskar utan. Forskning på lax visade att fiskar som var uppfödda i fångenskap inte överlevde i naturen. Någon berättade att djurskyddsorganet har tagit upp frågan men inte kommit fram till något.

Nästa workshop kommer hållas 2019 i Stockholm.

Karen Erlbacher



**Bilaga:** Programmet