



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences



Nationellt centrum för djurvård
Swedish Centre for Animal Welfare, SCAW
Föreståndare Mats Sjöquist

RAPPORT
2016-09-02

SLU ID: SLU.scaw.2016.2.2-28.

Hållning av zebrafisk i försöksdjursanläggningar

Hur påverkas djurvården av vattenvolym och fiskdensitet?

1. Innehåll

Bakgrund.....	2
Rapportens slutsats.....	3
Utgångspunkt	3
Djurvälfärd.....	3
Litteraturgenomgång zebrafisk - fiskdensitet och tankvolym.....	5
Stress.....	5
Beteende och tillväxt.....	6
Reproduktion.....	7
Sammanfattning	8
Generella länkar	8
Kommersiellt tillgängliga system	9
Forskare som deltagit i framtagningen av detta dokument	10
Forskare som tagit del av och ställt sig bakom skrivelsen	10
Referenser	11
Bilaga 1. Sammanställning internationell lagstiftning om inhysning zebrafisk.....	14

2. Bakgrund

Jordbruksverket omarbetar under 2016 Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om försöksdjur, saknr L150. Arbetet leds av Jessica Johansson, som är jurist på Jordbruksverket. Den nya skrivelsen ska presenteras för generaldirektören den 1 december för att beslutas vid årsskiftet 2016/17. Förslaget kommer att skickas på extern remiss runt den 1 september 2016. I samband med denna omarbetning har Nationellt centrum för djurvälfärd (SCAW) tagit initiativet till granskning av det vetenskapliga underlaget för föreskrifterna rörande hållningen av zebrafisk. Forskarna har rekryterats från SCAWs expertgrupp med intresse för zebrafisk. Utgångspunkten har varit att komma med förslag på ändring av föreskrifterna avseende hållning av zebrafisk utan negativa konsekvenser för djurens välfärd. Behovet av en uppdatering av föreskrifterna på denna punkt baseras på att Sverige har ett unikt krav på en minsta akvarievolymer för hållning av zebrafisk, som selektivt missgynnar svensk forskning. Föreskriftskravet gäller endast zebrafisk och inte andra jämförbara fiskarter. Kravet försvårar användande

av kommersiellt tillgängliga akvariesystem, som är anpassade för en förbättrad vattenkvalitet och för optimering av hygien men som inte når upp till de svenska kraven på volymstorlek.

Föreskriftsreglerna i L150 gäller en generell hållning av zebrafisk som används för vetenskapliga ändamål. För enskilda vetenskapliga studier kan forskaren och den djurförsöksetiska nämnden behöva anpassa kraven beroende på det försök som ska utföras. Kraven kan i vissa fall då behöva vara mer tillåtande än vad regelverket medger.

3. Rapportens slutsats

Det finns inga vetenskapligt grundade skäl för att bibehålla särkravet på minsta akvariestorlek för just zebrafisk. Detta krav gynnar inte zebrafiskarnas välfärd, men riskerar att försämra möjligheten att upprätthålla en hög vattenkvalitet och god hygien. Kravet försvårar även strävan att använda djurarter med lägsta möjliga neurosensoriska nivå och därmed minimera lidandet.

4. Utgångspunkt

Lagtexten som innefattar alla arter av fisk är generell vad gäller hållande av fisk. När det gäller arterna zebrafiskar finns idag både krav på maximal fisktäthet och minimivolym per akvarium. Zebrafiskar bör kunna omfattas av samma regler för hållande som andra mindre fiskarter, eftersom det saknas belägg för att zebrafiskar är unika och att deras välfärd skulle påverkas av andra faktorer jämfört med andra fiskarter som rutinmässigt hålls på forskningslaboratorier.

Djurvälfärd

När det gäller djurvälfärd så finns det olika syn på hur detta skall definieras men ett koncept, ”The Five Freedoms”, är väletablerat och accepterat och har sitt ursprung i en rapport från 1965 (The Brambell Report), som sedan formaliserades 1979 (Farm-Animal-Welfare-Council 1979).

The Five Freedoms definierar välfärd som:

1. Freedom from Hunger and Thirst: by ready access to fresh water and a diet to maintain full health and vigor.
2. Freedom from Discomfort: by providing an appropriate environment including shelter and a comfortable resting area.
3. Freedom from Pain, Injury or Disease: by prevention or rapid diagnosis and treatment
4. Freedom to Express Normal Behavior: by providing sufficient space, proper facilities and company of the animal's own kind.

5. Freedom from Fear and Distress: by ensuring conditions and treatment which avoid mental suffering.

I svensk översättning:

1. Frihet från hunger och törst genom tillgång till färskt vatten och en diet som upprätthåller fullständig hälsa och kraft.
2. Frihet från obehag genom att ordna med en lämplig miljö som inkluderar skydd och en komfortabel viloplats.
3. Frihet från smärta, skada och sjukdom genom förhindrande av detta eller snabb diagnos och behandling.
4. Frihet att utföra naturligt beteende genom att tillgodose djurets behov av, tillräckligt utrymme, rätt resurser och sällskap av djurets eget slag.
5. Frihet från rädsla och oro genom att säkra förutsättningar och behandlingar som undviker mentalt lidande.

(Wikipedia 2016-07-07,
<https://sv.wikipedia.org/wiki/Djurv%C3%A4lf%C3%A4rd>)

Idag är det en rad olika organisationer som använder denna definition av välfärd (World Organisation for Animal Health, the Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals, the American Society for the Prevention of Cruelty to Animals, Federation of Veterinarians of Europe). Även inom EU lagstiftningen tar man upp detta koncept som centralt när det gäller djurvälferden (http://ec.europa.eu/food/animals/welfare/index_en.htm). Vidare används även ”The five domains model” som omfattar områdena nutrition, miljö, hälsa, beteende samt mentalt tillstånd för att utvärdera ett djurs välfärd (Mellor & Beausoleil, 2015). Ytterligare ett koncept som tagits fram för att värdera djurs välfärd är ”Welfare Quality Concept®” som baseras på fyra välfärdsprinciper – foder, hälsa, inhysningsmiljö samt beteende (Blokhuis, Veissier, Miele, & Jones, 2010). Det som sammanfattar dessa olika modeller är att alla delar av ett djurs liv ingår i en välfärdsbedömning och ett område/princip/domän kan inte ersätta ett annat.

Djurvälferd kan mätas med resursbaserade eller djurbaserade mätparametrar. Resursbaserade parametrar (t.ex. akvariestorlek, fiskdensitet, ljusprogram, skötsel- och utfodringsrutiner) minskar risken för dålig välfärd. Men djurhållarens skötsel och de enskilda djurens olikheter i bakgrund och tidigare erfarenheter gör att djur kan reagera väldigt olika trots likartade yttre förhållanden. Det kan vara mer värdefullt att utvärdera välfärden med djurbaserade parametrar. Alltså, vad gav insatta resurser för resultat för det enskilda djurets välfärd?

Av de fem friheterna så är framförallt frihet nr 4 och 5 relevanta att diskutera i denna rapport, övriga tre punkter kan anses uppfyllda av föreskrifterna och är ej specificerade per djurslag.

5. Litteraturgenomgång zebrafisk - fiskdensitet och tankvolym

Stress

Definitionen av stress är inte enhetlig men stress kan beskrivas som en kaskad av fysiologiska förändringar som uppstår när en individ försöker att återställa homeostasen när den utsätts för en förändring (Schreck, Contreras-Sanchez, & Fitzpatrick, 2001). Responsen kan vara adaptiv vilket återställer homeostasen (allostas), men vid kronisk stress kan responsen övergå till att bli maladaptiv och leda till en nedreglering av immunsystemet, minskad tillväxt och reproduktion. Både akut och kronisk stress påverkar fiskvälfärden och förutom problemet för den stressade individen kan stressen också leda till att forskningsresultaten påverkas negativt vilket kan leda till att fler djur behöver användas. Det finns relativt många vetenskapliga artiklar som beskriver stress i olika fiskarter och det är tydligt att organisationen och funktion av de neuroendokrina systemen som är inblandade i stressresponsen hos zebrafisk (och andra fiskarter) liknar det man känner till från andra ryggradsdjur (D. Alsop & M. Vijayan, 2009); (D. Alsop & M. M. Vijayan, 2009); (Wendelaar Bonga, 1997).

Stressresponsen har två faser, den första och snabbaste responsen är en frisättning av katekolaminer (adrenalin och noradrenalin) från kromaffina celler i fisk belägna i njuren, om stressen kvarstår följs detta av en frisättning av kortisol från interrenalvävnad (Wendelaar Bonga, 1997)

När det gäller hållning av zebrafisk och effekten av akvarie- och vattenvolym och fiskdensitet på välfärdsaspekter finns det relativt få vetenskapliga artiklar. En genomgång av olika länders regelverk kring hållning av zebrafiskar visar att fokus ligger på fiskdensitet och inte vatten- eller akvarievolymer (se bilaga 1). Det finns några studier som har tittat på det som på engelska kallas "crowding stress", vilket ju handlar om densitet och inte primärt om total akvarievolymer, och hur detta påverkar kortisolnivåerna och i en del fall också uttrycket av HSP70 (heat shock protein). Noteras bör att det finns stora variationer i hur man definierar hög densitet. I en studie använde man 0,25 djur/liter som hög densitetsgrupp (Spence, Jordan, & Smith, 2006) medan i en annan studie definierade man hög densitet som 40 djur/liter (J. M. Ramsay et al., 2006). I studien av Ramsay et al. användes två olika fiskdensiteter och man testade två olika akvariestorlekar. I de större akvarierna (76 liter), höll man 0,25 djur/liter i kontrollgruppen och i testgruppen var densiteten 40 djur/liter. Både vid akut (3 timmar) och längre hållning (5 dagar) i hög densitet ökade koncentrationer av kortisol kraftigt (4 gånger normalnivåer) men bara i fiskar som fastats före försöket. Fiskar som matats visade inga förhöjda kortisolkoncentrationer. Resultaten påverkades också av tankstorleken, när man höll djuren i akvarier med en totalvolym på 4 liter så såg man ingen ökning av kortisolnivåerna mellan kontrollen (4 djur/liter) och testgruppen (40 djur/liter) (Jennifer M. Ramsay et al., 2006).

I en studie från 2013 av Pavlidis et al. studerade man effekterna av "crowding" och visade att man fick stora ökningar i kortisol (13-15 gångers ökning) vid hög fiskdensitet (1-10 djur/liter i 0,5- litersakvarier) jämfört med kontrollen 0,2 djur/liter, men även vid låg densitet (2-5 djur/liter i 2- litersakvarier) kunde man se en ökning vilket man förklarade med social stress i samband med bildandet av en socialt stabil grupp. Rekommendationen var att för att minimera stress beroende på densiteten bör man ha 5 individer per liter i minst 2- litersakvarier (Pavlidis et al., 2013). I en studie av Grönqvist och Berger från 2013 studerade man effekterna av olika stressorer (fiskdensitet, ljus med olika spektralsammansättning, födoing, och vibrationer) på koncentrationer av kortisol (analyserad från vattnet) och "heat shock proteiner" (HSP) där HSP70 uttrycket/koncentrationerna har visat sig korrelera med stress. I denna studie använde man 45, 20 och 5 liter som testmiljöer med fiskdensitet på 0,13, 0,3 och 1,2 djur/liter. Man kunde inte påvisa någon signifikant skillnad i beteende, kortisol eller HSP koncentration och slutsatsen var att ingen av de densiteter man testade hade någon effekt på stressnivån definierat som en förändring i beteende, kortisol eller HSP koncentration (Grönqvist & Berges, 2013).

6. Beteende och tillväxt

Konceptet "The Five Freedoms" ger vägledning i hantering och skötsel av djur för ökad djurvälstånd. Punkt 4 lyder: "Frihet att utföra naturligt beteende". Hur ska kraven på zebrafiskens levnadsutrymme regleras så att de gynnar förutsättningarna för normalt beteende? Man behöver här belysa begreppet djurvälstånd i laboratoriemiljöer i kontrast till zebrafiskens olika förutsättningar i naturen.

Zebrafiskar förekommer naturligt i miljöer i Indien, Nepal och Bangladesh och fisken lever i vitt skilda ekologiskt avgränsade biotoper. Från grunda vatten med lågt vattenflöde till djupa vatten med högt vattenflöde. Under sommarmånaderna kan zebrafisken i vilt tillstånd utsättas för temperaturer upp till 38°C och under vintern ända ner till 6°C, och därför behöver samma individ under året överleva vid mycket olika förhållanden. De stora skillnaderna i temperaturer och vattenflöden visar att zebrafiskar anpassar sig väl till en ny miljö (plastisk respons). Att fiskens beteende och fysiologi kan förändras med ändrade miljöförhållanden kan till exempel påvisas genom alternerande födoval. Detta har påvisats i vilt tillstånd där zebrafiskars föda ibland består av växter och ibland av insekter som fångas genom jakt (McClure, McIntyre, & McCune, 2006).

Zebrafiskens förmåga att även evolutionärt anpassa sig kan visas experimentellt genom att låta zebrafiskar som lever i vilt tillstånd förflyttas till en akvariemiljö i laboratorier och följa dessa fiskar över tid. För den vilda fisken som flyttats in i laboratoriet kan man visa att tillväxt-kurvan förändras (plastisk respons), och fiskarna har redan efter två generationer (evolutionär anpassning) nått samma

tillväxthastighet som de fiskar som under lång tid varit domesticerade (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008).

Sammantaget indikerar detta att zebrafiskar, som levt i laboratoriemiljö i många generationer, har utvecklat fler adaptiva egenskaper, som till exempel har med beteende inför skydd mot predatorer (signalsystem och stimbeteenden) att göra (Wright, Nakamichi, Krause, & Butlin, 2006). Däremot har andra beteenden, som till exempel när en fisk utövar dominans mot en annan fisk (förändrat simsätt och pigmentansamling i de långsgående ränderna hos den dominanta fisken) vilket man antar sker i naturen, visat sig frekvent förekommande hos "laboratoriefiskar" (Larson, O'Malley, & Melloni Jr, 2006). Dominanta och underordnade beteenden mellan två specifika zebrafiskar i ett akvarium kan avbrytas genom att förflytta fiskarna till andra akvarier med andra zebrafiskar. Om den dominanta och underordnade fisken däremot förflyttas till en ny miljö i form av enbart en större akvarievoly, kvarstår beteendet mellan dessa individer. Därmed är, åtminstone om man vill förebygga dominant beteende, en större tankvolym *per se* inte en åtgärd som främjar välfärd för zebrafisk.

Sammanfattningsvis så fokusera de artiklar som finns publicerade om stresseffekter på fiskdensitet inte på absolut tankvolym. Flera artiklar verkar komma fram till en fiskdensitet på runt 5 djur per liter (vuxna djur). Detta är inte i linje med de allmänna råd som finns i 2015:24,L150, kapitel 26, 5§, där man anger 1 djur per liter för fisk upp till 5 cm. Det verkar inte finnas något vetenskapligt stöd för att den absoluta tankvolymen skulle vara avgörande för fiskvälfärden hos zebrafisk men det finns tydliga indikationer på att fiskdensiteten är avgörande och oberoende av absolut tankvolym.

Reproduktion

Spence och Smith (2005) konstaterades att fiskdensiteten påverkade antalet ägg som honorna lade. I högdensitetsgruppen (15 djur/60 liter) minskade antalet ägg jämfört med lågdensitetsgruppen (3 djur/60 liter). Fiskdensiteten i denna studie var väldigt låg, 0,25 djur per liter i högdensitetsgruppen och 0,05 djur/liter i lågdensitetsgruppen. Författarna påpekar att resultaten kan bero på interaktion mellan rivaliserade hanar som påverkar honornas beteende eller konkurrens om ägglägningsplatsen mellan honorna. Tydligt är att även relativt låga densiteter kan ha en påverkan på äggläggningen hos zebrafisk (Spence & Smith, 2005). En alternativ förklaring är att det är stressande om fiskarna går i en för liten grupp med intensivare hackordning. I en studie av tankstorlekens effekt på reproduktionsförmågan visade man på negativa effekter av lekakvarier på 100 respektive 200 ml jämfört med kontrollen på 3500 ml (Goolish, Evans, Okutake, & Max, 1998). Men redan från 300 ml var det ingen skillnad mot 3500 ml.

Ett olämpligt hållande av djur resulterar ofta, men inte alltid, i en försämrad fortplantningsförmåga. Det finns inte många relevanta studier kring fortplantning när det rör zebrafisken. I en studie av Castranova m.fl. (2011) hölls zebrafiskar vid tätheter av 3, 6 eller 12 fiskar per liter i akvarier med volymer mellan 1,8 och 3 L i 8 olika laboratorier. Fiskar sattes sedan till lek i akvarier med volymer på 0,75 till 2 liter. De parametrar som studerades var genomsnittligt antal ägg (clutch) per lek, andelen som lekte framgångsrikt och andelen ägg som utvecklade sig. Det sammanlagda resultatet visar inga skillnad mellan de lika tätheterna, utan det var genomgående goda resultat i alla parametrar. Det fanns en del signifikanta effekter av täthet från de olika laboratorierna tagna var för sig, men dessa gick inte i någon konsekvent riktning. Studien testade inte effekten av stora akvarier jämfört med små, men däremot visade den att fortplantningen fungerade utmärkt även hos zebrafiskar som gick i mycket små akvarier (Castranova et al., 2011).

7. Sammanfattning

Det finns inget stöd i den vetenskapliga litteraturen att just volymen på akvariet skulle vara avgörande utan det verkar vara densiteten som är viktigast. Det är tydligt att densiteten påverkar stress och det finns en risk för stress både vid för låg och för hög densitet (Pavlidis et al., 2013); (Grönquist & Berges, 2013); (Larson et al., 2006)). Runt fem djur (vuxna) per liter verkar vara en rekommendation som används i många andra länder. Om fiskar pga. av regelverket måste flyttas mellan akvarier för hållning som idag har en minsta volym på 11 liter till ett av en etisk nämnd godkänd försöksakvarium (som kan ha minde volymer) innebär detta ett avsteg från punkterna 4 och 5. Man bryter upp socialt etablerade grupper (punkt 4) och nästan alla metoder för att flytta fisk innebär en viss stress för djuren (punkt 5). Stress kan ha negativa effekter på djuren som gör att man måste använda fler djur för att få ett tillräckligt statistiskt underlag (Parker, Millington, Combe, & Brennan, 2012); (Ramsay et al., 2009); (Casebolt, Speare, & Horney, 1998).

Mindre akvarievolymer underlättar den dagliga tillsynen av den enskilda individen i akvariet och också rengöringen av varje enskilt akvarium. Detta främjar både djurhälsa- och välfärd.

En nyligen publicerad artikel där man sammanställt data kring djurhållning och djurhälsa i olika zebrafiskfaciliteter världen över visar att i 18 av de 19 undersökta faciliteterna hålls vuxna zebrafiskar i snitt kring 5 fiskar per liter (Lawrence, Eisen, & Varga, 2016). I dessa studier har man inte specifikt utvärderat djurvälstånd med avseende på tankvolym.

8. Generella länkar

Guidance on the housing and care of zebrafish. Barney Reed, Maggy Jennings.

Research Animals Department, Science Group, RSPCA UK. 2011.

<http://www.rspca.org.uk/ImageLocator/LocateAsset?asset=document&assetId=1232723034494&mode=prd>

Nationella rekommendationer för fiskhållning i Kanada

<http://www.ccac.ca/en>

ZHA Blog

Available through ZHA. The ZHA blog can be accessed for viewing and targeted searching by anyone interested in zebrafish-husbandry-related topics, but actual posting is limited to members. Interested parties should navigate to (<http://www.nezhaonline.org/post/literist>).

Zebrafish Newsgroup

Available through Google Groups, the Zebrafish Newsgroup is moderated by ZFIN. The newsgroup is a moderated discussion group for anyone interested in zebrafish research. To subscribe and/or view archives, interested parties should navigate to (<http://groups.google.com/group/bionet.organisms.zebrafish/topics?hl=en&lnk=gschg>).

CompMed

Available through AAALAS (www.aalas.org), CompMed is a listserv for the discussion of comparative medicine, laboratory animals, and topics related to biomedical research. CompMed is limited to participants who are involved in some aspect of biomedical research or veterinary medicine, including veterinarians, technicians.

9. Kommersiellt tillgängliga system

Nedan följer en lista på de vanligaste leverantörerna av akvarieutrustning för vetenskaplig hållning av zebrafisk. Även de akvariestorlekar de tillhandahåller listas.

Tecniplast (Zebtec): <http://www.tecniplast.it/>, akvariestorlekar 1.1L, 3.5L and 8.0L

AquaSchwarz: <http://www.aquaschwarz.com/> , akvariestorlekar 1L, 3L, 5L, 7L och 8L

Aquatic Habitat: <http://pentairaes.com/z-hab-system.html> , akvariestorlekar 1.5L, 3L och 10L

Aquaneering: <http://www.aquaneering.com/> , akvariestorlekar 0.8L, 1.4L, 1.8L, 2.8L, 6.0L, och 9.5L

Aquatic Enterprises (Aquarius Fish Systems™):
<http://www.aquaticenterprises.com/> , akvariestorlekar 2L, 4L, och 8L

Thoren Aquatic Systems: http://thoren.com/Thoren_Aquatics/About_Us.htm , 1L och 3L

10. Forskare som deltagit i framtagningen av detta dokument

Michael Axelsson, michael.axelsson@bioenv.gu.se, Göteborgs universitet

Svante Winberg, svante.winberg@neuro.uu.se, Uppsala universitet

Bertil Borg, bertil.borg@zoologi.su.se, Stockholms universitet

Monika Andersson Lendahl, Monika.Andersson.Lendahl@ki.se, Karolinska institutet

Ola Svensson, ola.svensson@bioenv.gu.se , Göteborgs universitet

Elin Spangenberg, Elin.Spangenberg@slu.se, SLU/SCAW

Mats Sjöquist, Mats.Sjoquist@slu.se, SLU / SCAW

11. Forskare som tagit del av och ställt sig bakom skrivelsen

Jonas von Hofsten, jonas.von.hofsten@umu.se, Umeå universitet,

Johan Ledin, johan.ledin@scilifelab.uu.se, Uppsala universitet

Per-Erik Olsson, per-erik.olsson@oru.se, Örebro universitet

Lasse Jensen, lasse.jensen@liu.se, Linköping universitet
Fredrik Ek, fredrik.ek@med.lu.se, Lunds universitet
Jenny Landin, Jenny.Landin@neuro.gu.se, Göteborgs universitet
Petronella Kettunen, petronella.kettunen@neuro.gu.se, Göteborgs universitet
Alexandra Abramsson, alexandra.abramsson.2@gu.se, Göteborgs universitet
Stefan Örn, stefan.orn@slu.se, SLU
Håkan Olsén, hakan.olsen@sh.se, Södertörns Högskola
Sandra Ceccatelli, Sandra.Ceccatelli@ki.se, Karolinska Institutet
Anders Arner, Anders.Arner@ki.se, Karolinska Institutet
Olov Andersson, Olov.Andersson@ki.se, Karolinska Institutet
Per Ahlberg, Per.Ahlberg@ebc.uu.se, Uppsala universitet
Simone Immler, Simone.Immler@ebc.uu.se, Uppsala universitet
Katarina Garpenstrand, katarina.garpenstrand@scilifelab.uu.se, Uppsala universitet
Lena Claesson-Welsh, lena.welsh@igp.uu.se, Uppsala universitet
Monika Schmitz, monika.schmitz@ebc.uu.se, Uppsala universitet
Yihai Cao, Yihai.Cao@ki.se, Karolinska Institutet
Dan Larhammar, Dan.Larhammar@neuro.uu.se, Uppsala universitet
Lina Emilsson, lina.emilsson@ebc.uu.se, Uppsala universitet
Marcel den Hoed, marcel.den_hoed@medsci.uu.se, Uppsala universitet

12. Referenser

- Alsop, D., & Vijayan, M. (2009). The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General and Comparative Endocrinology*, 161(1), 62-66.
doi:10.1016/j.ygcen.2008.09.011
- Alsop, D., & Vijayan, M. M. (2009). Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 153(1), 49-54. doi:10.1016/j.cbpa.2008.12.008

- Blokhuis, H. J., Veissier, I., Miele, M., & Jones, B. (2010). The Welfare Quality® project and beyond: Safeguarding farm animal well-being. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, *60*(3), 129-140. doi:10.1080/09064702.2010.523480
- Casebolt, D. B., Speare, D. J., & Horney, B. S. (1998). Care and Use of Fish as Laboratory Animals: Current State of Knowledge. *Laboratory Animal Science*, *48*(2), 124-136.
- Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D. P., Best, J., Coscolla, J., . . . Weinstein, B. M. (2011). The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, *8*(3), 141-146. doi:10.1089/zeb.2011.0688
- Goolish, E. M., Evans, R., Okutake, K., & Max, R. (1998). Chamber Volume Requirements for Reproduction of the Zebrafish *Danio rerio*. *The Progressive Fish-Culturist*, *60*(2), 127-132. doi:10.1577/1548-8640(1998)060<0127:CVRFRO>2.0.CO;2
- Grönquist, D., & Berges, J. A. (2013). Effects of Aquarium-Related Stressors on the Zebrafish: A Comparison of Behavioral, Physiological, and Biochemical Indicators. *Journal of Aquatic Animal Health*, *25*(1), 53-65. doi:10.1080/08997659.2012.747450
- Larson, E. T., O'Malley, D. M., & Melloni Jr, R. H. (2006). Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, *167*(1), 94-102. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.020>
- Lawrence, C., Eisen, J. S., & Varga, Z. M. (2016). Husbandry and Health Program Survey Synopsis. *Zebrafish*, *13*(S1), S-5-S-7. doi:10.1089/zeb.2016.1309
- McClure, M. M., McIntyre, P. B., & McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, *69*(2), 553-570. doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x
- Mellor, D. J., & Beausoleil, N. J. (2015). Extending the 'Five Domains' model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states. *Animal Welfare*, *24*(3), 241-253. doi:10.7120/09627286.24.3.241
- Parker, M. O., Millington, M. E., Combe, F. J., & Brennan, C. H. (2012). Housing Conditions Differentially Affect Physiological and Behavioural Stress Responses of Zebrafish, as well as the Response to Anxiolytics. *PLoS ONE*, *7*(4), e34992. doi:10.1371/journal.pone.0034992
- Pavlidis, M., Digka, N., Theodoridi, A., Campo, A., Barsakis, K., Skouradakis, G., . . . Tsalafouta, A. (2013). Husbandry of Zebrafish, *Danio Rerio*, and the Cortisol Stress Response. *Zebrafish*, *10*(4), 524-531. doi:10.1089/zeb.2012.0819
- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M., Kent, M. L., & Schreck, C. B. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, *258*(1-4), 565-574. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.020

- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M., Kent, M. L., & Schreck, C. B. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, *258*(1–4), 565-574. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.020>
- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M., Kent, M. L., & Schreck, C. B. (2009). Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, *297*(1-4), 157-162.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., & Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, *197*(1-4), 3-24. doi:10.1016/S0044-8486(01)00580-4
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, *83*(1), 13-34. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x
- Spence, R., Jordan, W. C., & Smith, C. (2006). Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Frontiers in Zoology*, *3*(1), 1-6. doi:10.1186/1742-9994-3-5
- Spence, R., & Smith, C. (2005). Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, *69*(6), 1317-1323. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.10.010>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, *77*(3), 591-625.
- Wright, D., Nakamichi, R., Krause, J., & Butlin, R. K. (2006). QTL Analysis of Behavioral and Morphological Differentiation Between Wild and Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Behavior Genetics*, *36*(2), 271-284. doi:10.1007/s10519-005-9029-4

13. Bilaga 1. Sammanställning internationell lagstiftning om inhysning zebrafisk

ENGLAND

Svar 1

Our guideline, which is based on best practice and is not yet mandated by the EU directive but will be if the current draft comes through on Jan 1st, 2017, is 5 fish per litre. That is for adults. For larvae up to 5 days old we can keep up to 15 in a standard Petri dish.

We do not state a min or max tank size but base it all on stocking density.

Svar 2

There is no Home Office guidance specific to zebrafish. I attach the code of practice for aquatics & co for info. (Jean-Philippe Mocho)

Det bifogades Code of Practice från Home Office, som var väldigt allmänt skrivet vad gäller fisk. Betydligt mer mått för andra djur.

I denna fanns en referens till RSPCA för Guidance rörande Zebrafisk. Här finns en litteraturgenomgång på volumes och stocking densities bl a. Dock några år gamla.

NYA ZEALAND

Har inga nationella regler, svar i korthet "The national animal welfare system sets general rules and guidelines rather than specifically stating sizes of tanks etc. Details are left to local animal ethics committees."

USA, KALIFORNIEN

Hänvisar till Barney Reed & Maggy Jennings, Research Animals Department, Science Group, RSPCA

KANADA

Hänvisar till Barney Reed & Maggy Jennings, Research Animals Department, Science Group, RSPCA

FINLAND

Finland har inga specifika regler. Finns ev rekommendationer från zooindustrin men inga juridiska krav. (Satu Rausi svarade)

NORGE

Även Norge har valt att inte detaljbeskriva hållningsföreskrifterna. Inget specifikt för zebrafisk.

ISLAND

Ingen reglering av akvariestorlek.

DANMARK

Danmarks regler för försöksdjur är en direkt implementering av EU direktivet, och har inga specifika anvisningar för zebrafisk.

AUSTRALIEN

Inga specifika regler vad gäller inhysning/stocking density.

SCHWEIZ

Inga specifika regler för zebrafisk "The current ornamental fish guidelines apply."
Hänvisar till Barney Reed & Maggy Jennings, Research Animals Department, Science Group, RSPCA.