

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
nr.	document NTS 2016766	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage 1			x						
5	Bijlage 2			x						
6	Bijlage 1 aangepast			x						
7	Bijlage 2 aangepast			x						
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Advies CCD		x							x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x		



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

AVD246002016766

### 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 24600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Schothorst Feed Research B.V.</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>39084732</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Meerkoetenweg 26</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>Postbus 533</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>8200 AM Lelystad</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL24RABO0337738394</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Schothorst Feed Research B.V.</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Schothorst Feed Research B.V.	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	39084732	Straat en huisnummer	Meerkoetenweg 26	Postbus	Postbus 533	Postcode en plaats	8200 AM Lelystad	IBAN	NL24RABO0337738394	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Schothorst Feed Research B.V.
Naam instelling of organisatie	Schothorst Feed Research B.V.																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	39084732																	
Straat en huisnummer	Meerkoetenweg 26																	
Postbus	Postbus 533																	
Postcode en plaats	8200 AM Lelystad																	
IBAN	NL24RABO0337738394																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Schothorst Feed Research B.V.																	
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>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker [REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker [REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																
Functie	Onderzoeker [REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker [REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker [REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																
Functie	Onderzoeker [REDACTED]																	
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 checked="" type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
	<input 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
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> 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 <i>melding</i> 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	1 - 1 - 2017
	Einddatum	1 - 1 - 2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Verbeteren van darmgezondheid in pluimvee	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Wageningen UR
	Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
	E-mailadres	DEC@wur.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187,00 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

2 bijlagen.

## 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 1.7). 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

Lelystad

Datum

6 - 12 - 2016

Handtekening

[Redacted]



## Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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.

### 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.

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

Infectieziekten spelen een belangrijke rol in de pluimvee-industrie vanwege productieverliezen, verhoogde sterfte, verminderd dierwelzijn en een verhoogd besmettingsrisico van pluimveeproducten voor menselijke consumptie (Timbermont et al., 2011). Diverse pathogenen, waaronder virussen, bacteriën, en parasieten, zijn verantwoordelijk voor het ontstaan van infectieziekten, zowel alleen of in combinatie met elkaar (Antonissen et al., 2014, 2015; Stanley et al., 2014). Veel aandoeningen bij pluimvee zijn geassocieerd met darmproblemen, zoals dysbacteriose, colibacillose, malabsorptie syndroom, coccidiose, Salmonella, Campylobacter en necrotische enteritis (NE). Met name coccidiose en NE zijn wereldwijd een ernstig probleem, waarbij de gezondheid van het dier direct geschaad wordt. Naar schatting is de financiële schade als gevolg van coccidiose wereldwijd 2 miljard euro per jaar en voor necrotische enteritis rond de 6 miljard euro per jaar ([www.veearts.nl](http://www.veearts.nl); [www.worldpoultry.net](http://www.worldpoultry.net)). Beiden worden hieronder wat gedetailleerder besproken.

Coccidiose wordt veroorzaakt door eencellige parasieten (protozoën) uit de *Eimeria* familie, die de darmcellen beschadigen. Ziekteverschijnselen zijn apathisch gedrag, bol zitten, een slecht verenkleed, natte en soms bloederige mest en een lage voeropname. Door de darmschade verslechtert de absorptie van nutriënten, met als gevolg een slechtere groei (Amerah en Ravindran, 2015). De parasiet produceert oöcysten die met de mest uitgescheiden worden en die uitermate lastig te bestrijden zijn. Daarom is het belangrijk om de infectiedruk in het dier en in de omgeving laag te houden.

Hiervoor worden bij vleeskuikens coccidiostatica in het voer gebruikt. Dit is op zichzelf een effectieve aanpak, hoewel de parasieten resistent kunnen worden tegen de actieve stof. Dat betekent dat er toch problemen met klinische coccidiose kunnen ontstaan, die behandeling met antibiotica nodig maken. Daarnaast is er een categorie coccidiostatica die naast een anticoccidiose-effect ook een antibacterieel effect heeft. Vanwege dat laatste is het niet ondenkbaar dat deze categorie binnen afzienbare tijd niet meer toegelaten is voor gebruik in pluimvee (M'Sadeq et al., 2015). Dat zou de mogelijkheden om coccidiose te voorkomen enorm beperken. Coccidiostatica zijn niet toegelaten bij legpluimvee.

Vaccinatie kan ook een manier zijn om coccidiose te voorkomen (Mot et al., 2014), maar heeft ook een groot nadeel. Een dergelijk vaccin bestaat namelijk uit levende (verzwakte) parasieten. Dat betekent dat er juist een risico kan zijn op coccidiose (of NE als secundaire infectie) en slechtere productieprestaties (Lee et al., 2011).

Necrotische enteritis is een darmontsteking met weefselversterf bij vleeskuikens en wordt veroorzaakt door de Grampositieve, sporevormende bacterie *Clostridium perfringens*, die gewoonlijk gevonden wordt in de blindedarmen van gezond pluimvee. De bacterie kan tot ziekteverschijnselen leiden als een toxineproducerende stam van *C. perfringens* aanslaat in andere delen van de darm. De kans daarop wordt aanzienlijk vergroot bij verminderde darmgezondheid, bijvoorbeeld door stress, voedingsfactoren, immunosuppressie, mycotoxicose of coccidiose.

NE roept een acute fase respons op die een reductie veroorzaakt in de voeropname en een toename in de afbraak van spierweefsel. De klinische verschijnselen bij de acute vorm zijn bloederige mest en uitval die kan oplopen tot 50%. Bij sectie worden ernstige darmbeschadigingen gevonden. In de subklinische vorm zijn de kuikens traag en vertonen een achterblijvende productie (m.n. verlaagde voeropname en groei), maar de sterfte hoeft niet verhoogd te zijn; het koppel wordt ongelijkmatig. Vroege verschijnselen van NE zijn natte mest, diarree en nat strooisel. Zowel in de acute vorm als in de subklinische vorm kan het percentage afkeuringen bij de slacht als gevolg van leverafwijkingen hoog zijn (Løvland en Kaldhusdal, 1999). De leverafwijkingen worden veroorzaakt door toxines die door *C. perfringens* geproduceerd worden. NE maakt de behandeling met antibiotica noodzakelijk.

Door de problematiek met resistentie tegen coccidiostatica, het wegvallen van antimicrobiële groeibevorderaars (AMGB's) – waarmee een aantal van deze ziektes onder controle gehouden kon worden - en de steeds striktere regelgeving om het therapeutische gebruik van antibiotica te beperken, wordt de vraag naar nieuwe, effectieve middelen en strategieën steeds groter. Dit kunnen (oraal

toegepaste) farmaceutische middelen zijn, maar ook alternatieven zoals organische zuren, plantenextracten, probiotica, prebiotica, mineralen, kruiden, specerijen, etherische oliën en immunostimulanten (Huygebaert et al., 2011). Het werkingsmechanisme van deze alternatieven is zeer divers, en omvat effecten als immuunmodulatie (bijv. door betaglucanen in veevoedergrondstoffen en/of additieven), ontstekingsremming (bijv. door flavonoïden in plantextracten), antioxidant activiteit (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015), antibacteriële activiteit (bijv. door organische zuren), verbetering van de verteerbaarheid, verbetering van de darmintegriteit, het bewerkstelligen van een stabiele microflora in de darm (bijv. door prebiotica), of versneld herstel na ziekte (Caly et al., 2015).

### **Samenvattend:**

In dit project wordt het effect van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën op darminfecties bij pluimvee onderzocht. De proeven worden uitgevoerd om darmschade te verminderen en/of herstel te bevorderen. Naast groei, voeropname en voederconversie zijn ook darmlaesies, bacterieprofielen van de darminhoud, immuunresponsen, histologische metingen, bacteriologisch onderzoek, etc. relevante uitleesparameters.

### **Referenties**

Amerah, A.M., Ravindran, V., 2015. Effect of coccidian challenge and natural betaine supplementation on performance, nutrient utilization, and intestinal lesion scores of broiler chickens fed suboptimal level of dietary methionine. *Poult Sci.* 94:673-80.

Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., et al., 2014. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins.* 6:430-452.

Antonissen, G., Croubels, S., Pasmans, F., et al., 2015. Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in broiler chickens, predisposing to necrotic enteritis. *Vet Res* 46:98.

Caly, D.L., D'Inca, R., Auclair, E., et al., 2015. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. *Front Microbiol.* 6:1336.

Huygebaert, G., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters. *Vet J.* 187:182-188.

Lee, J.T., Eckert, N.H., Ameiss, K.A., et al., 2011. The effect of dietary protein level on performance characteristics of coccidiosis vaccinated and nonvaccinated broilers following mixed-species Eimeria challenge. *Poult Sci* 90:1916-25.

Løvland, A. en Kaldhusdal, M., 1999. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunological and Medical Microbiology* 24:345-351.

Mot, D., Timbermont, L., Haesebrouck, F., et al., 2014. Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathol.* 43:290-300.

M'Sadeq, S.A., Wu, S., Swick, R.A., et al., 2015. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim Nutr.* 1:1-11.

Quiroz-Castañeda, R.E., Dantán-González, E., 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *Biomed Res Int.* [Epub ahead of print]

Stanley, D., Wu, S.B., Rodgers, N., et al., 2014. Differential responses of cecal microbiota to fishmeal,

Eimeria and Clostridium perfringens in a necrotic enteritis challenge model in chickens. PLoS One. 9:e104739.

Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., et al., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. Avian Pathol 40:341-347.

[www.veearts.nl/dierziekten/coccidiose-pluimvee/](http://www.veearts.nl/dierziekten/coccidiose-pluimvee/)

[www.worldpoultry.net](http://www.worldpoultry.net)

---

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van het project is het onderzoeken van manieren om de effecten van darminfecties bij pluimvee te verminderen en/of het herstel te bevorderen. Enkele voorbeelden van onderzoeksvragen die hierbij aan bod kunnen komen, zijn:

- Wat is het effect van het testproduct of de voerstrategie op zoötechnische prestaties bij pluimvee onder infectieuze omstandigheden?
- Wat is het effect van het testproduct of de voerstrategie op gezondheidsparameters bij pluimvee onder infectieuze omstandigheden?
- Wat is de optimale dosering van het testproduct?
- Hoe presteert het testproduct ten opzichte van een competitor product?

#### Haalbaarheid

De kans dat bovenstaande onderzoeksvraag binnen de looptijd van het project wordt beantwoord is zeer groot. Het instituut is een onafhankelijk privaat kennis- en informatiecentrum voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvragen te beantwoorden, evenals specifieke en gestandaardiseerde modellen om milde infecties na te bootsen. Vanwege de onafhankelijke positie voert het instituut regelmatig onderzoek op dit gebied uit, en heeft dan ook zeer veel ervaring met het uitvoeren van dit type studies.

Beschikbare expertises zijn kennis van dierfysiologie, darmgezondheid, microbiologie, grondstoffen, voeradditieven, ervaring met het uitvoeren van infectieproeven en de daarbij behorende eisen aan monsternamen.

Het instituut heeft dierfaciliteiten en specifieke en gestandaardiseerde modellen die geschikt zijn voor het uitvoeren van de onderzoeksvragen in dit project, . Het instituut heeft een vaste groep onderzoekers in dienst die bijna allemaal een Ir-, MSc- of PhD- titel bezitten. Ook de dierverzorgers en overige proefbegeleiders bestaan uit een vaste groep medewerkers met veel ervaring in het verzorgen van (proef)dieren, het verzamelen van monsters en ander biologisch materiaal ter beantwoording van de onderzoeksvragen, evenals het verzamelen en verwerken van proefdata. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan deze projecten, waardoor de voortgang van het project is gewaarborgd.

---

### 3.3 Belang

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

De maatschappij hecht grote waarde aan thema's zoals voedselveiligheid, antibioticareductie, dierwelzijn en milieu. Infectieziekten zijn een bedreiging voor deze thema's. De proeven die onder dit project worden uitgevoerd, dragen bij aan het voorkómen en/of bestrijden van infectieziekten, en hebben



daarom naast een direct positief effect op de gezondheid van het dier ook een maatschappelijke impact. Er is een voortdurende ontwikkeling gaande naar (genees)middelen of alternatieven die preventief of therapeutisch ingezet kunnen worden om de diergezondheid te verbeteren. Soms worden bestaande componenten waarvan de effectiviteit al is aangetoond verder verbeterd, waardoor bijvoorbeeld een lagere dosering of een kortere behandelduur volstaat, of waardoor de technologische toepassing verbetert (bijvoorbeeld betere hitteresistentie voor toepassing in gepelleteerde voeders). Het belang van dit project is het onderzoeken van de effectiviteit van deze nieuwe en/of verbeterde middelen en voerconcepten.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Proeven die onder dit project vallen, zijn meestal losstaande proeven die op basis van contractresearch worden uitgevoerd. De diercategorie en de frequentie waarmee de proeven worden uitgevoerd, evenals het type testproduct of de voerstrategie die onderzocht wordt, hangen af van de vraag van de klant. Dit project omvat de diersoort pluimvee met daarbinnen de categorie vleeskuikens.

Het contractresearch betreft projecten die op aanvraag van de farmaceutische industrie of toeleveranciers van de mengvoerindustrie uitgevoerd worden. De producten die onderzocht worden, zijn doorgaans in een ontwikkelings- of verbeterfase, maar er kunnen ook vergelijkende studies worden uitgevoerd waarin meerdere testproducten tegelijkertijd worden getest en onderling vergeleken. Het contractresearch kenmerkt zich door kortlopende projecten. Samen met de opdrachtgever wordt door de onderzoekers van het instituut een proefopzet vastgesteld.

Voorafgaand aan de uitvoering worden de volgende items op een rij gezet om tot de beste proefopzet te komen:

- Binnen welke categorie valt het testproduct (bijv. farmaceutisch product, organisch zuur, probioticum, etc.).
- Wat is het werkingsmechanisme van het testproduct en welk infectiemodel past daar het beste bij.
- Hoe dient het testproduct verwerkt of verstrekt te worden (via gepelleteerd voer, ongepelleteerd voer, drinkwater, orale inoculatie, sprayvaccinatie, etc.) en in welke dosering(en).
- Welke responsparameters (naast groei, voeropname en voederconversie) worden beïnvloed door het additief of de voerstrategie.
- Welk type monster is nodig om de vorige onderzoeksvraag te beantwoorden (bijv. bloed, weefsel, etc.).

Informatie over deze items wordt gezocht in de literatuur, gebaseerd op kennis en ervaring van de onderzoeker, gebaseerd op informatie van de toeleverancier of een pilotstudie, en/of gebaseerd op *in vitro* onderzoek.

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

Studies met infectiemodellen worden uitgevoerd in faciliteiten die voor dit doel geschikt zijn. De proefperiode is afhankelijk van het doeldier en het gekozen infectiemodel. De details staan in de bijlages.

Proeven onder deze projectaanvraag bestaan uit 3 tot 8 behandelingen en zijn, afhankelijk van het proefdoel, zodanig opgezet dat er getoetst kan worden op behandelingseffecten, maar ook op het toetsen van hoofdeffecten en interacties tussen type testproduct en dosering. In alle proeven worden standaard de productieparameters (groei, voeropname, voederconversie, uitval, etc.) gemeten. Daarnaast worden afhankelijk van het werkingsmechanisme van het testproduct en het gekozen infectiemodel specifieke uitleesparameters onderzocht, zoals darmlaesies, bacteriologische uitscheiding, immuunparameters, darmbacterieprofielen, etc.

#### 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.

De proeven in dit project zijn niet onderling gerelateerd en staan in principe los van elkaar. Ze worden uitgevoerd in kortlopende projecten. Door de ruime ervaring met diverse categorieën testproducten zijn de onderzoekers binnen het instituut in staat om opdrachtgevers voorafgaand aan een proef goed te adviseren over welk type infectiemodel het meest geschikt is, welke analyses wel of niet relevant of haalbaar zijn, en welke monsternamemomenten het meest geschikt zijn.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	infectiemodel coccidiose
2	infectiemodel necrotische enteritis
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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           |
|------------|--------------------------|
| 1          | Infectiemodel coccidiose |

*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.

Het doel van de proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om coccidiose te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na coccidiose te verbeteren. Coccidiose wordt veroorzaakt door Eimeria parasieten.

Eimeria spp. heeft een complexe levenscyclus. Nadat een oöcyste is uitgescheiden, moet deze eerst onder invloed van vocht en warmte in het strooisel sporuleren. Een gesporuleerde oöcyste is het infectieuze stadium. Als deze wordt opgenomen door een kip, komen de parasieten vrij in de darm en dringen daar de darmcellen binnen. In de darmcellen ontwikkelen de parasieten zich verder, totdat ze op een gegeven moment uit de cel barsten. De parasieten dringen dan weer nieuwe darmcellen binnen voor het volgende stadium van hun ontwikkeling totdat ze weer uit de darmcel barsten. Na het doorlopen van een aantal van deze aseksuele ontwikkelingsstadia is er een seksueel stadium waarbij een zygote gevormd wordt. Na omhulling met een celwand wordt gesproken over een oöcyste. Deze oöcyste wordt met de mest uitgescheiden, en de cyclus kan opnieuw beginnen. De periode tussen opname van een gesporuleerde oöcyste en uitscheiding van de nieuwe generatie oöcysten is afhankelijk van de Eimeria species, en kan variëren tussen 4 en 7 dagen. Het algemene klinische beeld van coccidiose is: slome kuikens, ruig verenkled, slechte uniformiteit in het koppel, natte mest (soms bloederig), onverteerde voerdeeltjes in de mest en slechte groei. Bij sectie van zieke dieren wordt darmschade gevonden.

De belangrijkste Eimeria species voor vleeskuikens staan hieronder genoemd:

- *E. acervulina* is de minst pathogene species, beschadigt voornamelijk het epitheel in het duodenum en heeft een hoge oöcysten-productie. Er is geen tot weinig uitval, maar er is vooral slechtere groei en voederconversie.
- *E. maxima* beschadigt voornamelijk de epitheelcellen van het duodenum en jejunum, produceert

minder oöcysten dan *E. acervulina*, maar kan wel uitval veroorzaken en veel economische schade als gevolg van slechtere groei en voederconversie.

- *E. tenella* beschadigt het epitheel van de blindedarmen, wat dusdanig ernstig kan zijn dat bloederige mest uitgescheiden wordt. De sterfte kan bij een klinische *E. tenella* infectie hoog zijn.

Het coccidiose-infectiemodel wordt vrijwel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door orale inoculatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten.

In de praktijk blijft coccidiose meestal niet beperkt tot één *Eimeria* species. Daarom wordt in het model gekozen voor een menginfectie van de drie hierboven genoemde species, waarbij rekening gehouden wordt met het verschil in pathogeniciteit. Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. Alle dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. Het doel hiervan is dat het verloop van de infectie volledig gecontroleerd wordt, want alle dieren bevinden zich op zeker moment in ongeveer hetzelfde stadium van infectie of herstel.
2. Slechts enkele dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. De geïnoculeerde dieren gaan na ongeveer een week de nieuwe generatie oöcysten uitscheiden die opgenomen kunnen worden door de contactdieren binnen de experimentele eenheid. Een dergelijk transmissie-experiment heeft als doel om een veldinfectie zoveel mogelijk na te bootsen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is. Aanpak 1 is vooral geschikt voor een Proof of Principle of voor een onderzoeksvraag waarbij de variatie in productiestatistieken binnen een experimentele eenheid zo klein mogelijk moet zijn. Aanpak 2 is juist geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij de praktijksituatie het uitgangspunt is, namelijk variatie binnen de contactdieren in een experimentele eenheid wat betreft het tijdstip van besmetting en de infectieuze dosis die het dier uit de omgeving opneemt. Aanpak 2 zal over het algemeen tot meer variatie in productiestatistieken binnen een experimentele eenheid leiden dan aanpak 1.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - namelijk een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Een negatieve controlegroep wordt oraal geïnoculeerd met phosphate buffered saline - PBS - in plaats van *Eimeria spp.* Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: tellen van oöcysten in de mest (OPG = oöcysten per gram).

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaaniveau te beoordelen.

---

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Aanpak 1: alle dieren in de proef worden rond dag 18 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ca. 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 3 seconden per dier.

Aanpak 2: ongeveer 20% van het aantal dieren in een experimentele eenheid wordt rond dag 10 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ongeveer 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 15 seconden per dier. Dit zijn seeder dieren. Deze dieren worden gemerkt met een vleugelmerk of pootring. De overige 80% zijn contactdieren, die de infectie na ongeveer een week via de natuurlijke route (namelijk via geïnfecteerde mest) van de geïnoculeerde dieren oppikken. De contactdieren worden dus rond dag 17-18 geïnfecteerd. Op deze manier sluiten beide aanpakken weer op elkaar aan.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef duurt tot de gebruikelijke slachtleeftijd voor vleeskuikens (35-42 dagen). Afhankelijk van het aantal voerfasen worden

de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

Na inoculatie wordt per experimentele eenheid wekelijks mest verzameld voor OPG.

Bij aanpak 1 worden rond dag 6 na inoculatie 3 dieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Deze procedure wordt na een week nog eens herhaald.

Bij aanpak 2 worden rond dag 6 na inoculatie 2 seeders random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Op 7 en 14 dagen na deze procedure worden 3 contactdieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren.

Bij de dieren waarbij darmlaesies gescoord worden, kan tegelijkertijd bloed of (darm)weefsel afgenomen worden voor aanvullend onderzoek.

Afhankelijk van het type additief is in sommige gevallen een extra monsternamen nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor de kinetiek van antilichaamresponsen. Bloedafname duurt ongeveer 30 seconden per dier. Deze extra handeling wordt uitgevoerd bij maximaal 3 random geselecteerde dieren per hok op maximaal twee tijdstippen (eenmaal per week).

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste  $P \leq 0,05$ . Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Coccidioseproeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekest, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuikens aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

### Geschatte aantallen:

Aanpak 1: de proef start met 20 kuikens per proefeenheid.

Aanpak 2: de proef start met 22 kuikens per proefeenheid.

Het verschil in startaantal wordt verklaard door het extra sectiemoment bij Aanpak 2.

Met de aanname dat alle proeven volgens Aanpak 2 worden uitgevoerd, zijn er per proef naar schatting 8

behandelingen x 6 herhalingen x 22 = 1056 dieren. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal 5 x 3 x 1056 = 15840 vleeskuikens.

### 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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

De additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. De effectiviteit in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab. Dit geldt in het bijzonder voor een parasiet als Eimeria, die een complexe levenscyclus heeft die moeilijk *in vitro* is na te bootsen.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn. Coccidiose is een diersoortspecifieke ziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

#### Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

#### Verfijning

De doseringen van Eimeria spp. zijn zodanig dat een milde coccidiose wordt beoogd, met effecten op productieprestaties, maar met zo min mogelijk darmschade, waardoor het ongerief wordt verkleind. Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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.

- Alle handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

## 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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

## 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.

.

### 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.

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

## 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.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van coccidiose laten zien, zoals sloomheid, natte mest en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt.

### 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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verwachte verschijnselen als gevolg van milde coccidiose (sloomheid, natte mest, lagere voeropname) duren meestal enkele dagen. Dieren die langer dan verwacht (meer dan 5 dagen) of ernstiger symptomen hebben dan een milde coccidiose (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging), hebben een humaan eindpunt bereikt en worden onmiddellijk geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

### 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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparameter. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd worden.

Coccidiose vormt geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis. Aangezien het hier echter gaat om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt, is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen. Daarom worden dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd.

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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                      |
|------------|-------------------------------------|
| 2          | infectiemodel necrotische enteritis |

*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.

Het doel van de proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om necrotische enteritis (NE) te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na NE te verbeteren. NE wordt veroorzaakt door toxineproducerende *Clostridium perfringens*. Dit is een Grampositieve bacterie die zich in de blindedarmen van pluimvee ophoudt. De bacterie veroorzaakt hier in principe geen schade. Onder bepaalde omstandigheden kan de bacterie uitgroeien op andere plaatsen in de darm, en veroorzaakt dan ernstige darmschade met weefselversterf. Een belangrijke predisponerende factor voor het laten aanslaan van *C. perfringens* is reeds aanwezige darmschade, bijvoorbeeld als gevolg van coccidiose. Ook een verhoogde viscositeit in de darm of een teveel aan onverteerd ruw eiwit zijn uitgesproken risicofactoren voor het ontstaan van NE. Een verhoogde viscositeit zorgt voor een langzamere passagesnelheid van de digesta. Daardoor is er een aanbod van nutriënten in de achterste delen van de darm, waar *C. perfringens* van kan profiteren. Een teveel aan onverteerd ruw eiwit wordt gefermenteerd door de microbiota in de darm. De fermentatieproducten die daarbij ontstaan beschadigen de darm.

De klinische verschijnselen bij de acute vorm zijn bloederige mest en sterfte, die in de praktijk kan oplopen tot 50%. De infectie roept een acute fase respons op die een reductie veroorzaakt in de voeropname en een toename in afbraak van spierweefsel. Bij sectie worden ernstige darmbeschadigingen gevonden. In de subklinische vorm zijn de kuikens traag en vertonen een achterblijvende productie (m.n. verlaagde voeropname en groei), maar de sterfte hoeft niet verhoogd te zijn; het koppel als geheel wordt ongelijkmatig.

Vroege verschijnselen van NE zijn natte mest, diarree en nat strooisel. Zowel in de acute vorm als in de subklinische vorm kan het percentage afkeuringen bij de slacht als gevolg van leverafwijkingen hoog zijn. Een uitbraak van NE maakt in de praktijk een behandeling met antibiotica noodzakelijk.

Aangezien NE een typische vleeskuikenziekte is, wordt het NE-infectiemodel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door een combinatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten en *C. perfringens* bacteriën.

Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. De testproducten worden onderzocht op de effecten op darmniveau en op productieprestaties. Dit betekent dat de dieren gedurende een periode van 35 tot 42 dagen worden gevolgd. Deze periode komt overeen met de praktijk.
2. De testproducten worden alleen onderzocht op de effecten op darmniveau. In dat geval duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is.

Aanpak 1 is geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van primair belang is. Deze additieven beogen vaak al in de periode voorafgaand aan de infectie een zodanig effect op het dier en/of in de darm te hebben, dat de infectie minder gemakkelijk aanslaat, of waarbij het dier na de infectie sneller herstelt. Herstel betekent bij Aanpak 1 niet alleen herstel van de darmintegriteit, maar ook herstel van de voeropname en groei.

Aanpak 2 is vooral geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van ondergeschikt belang is. Vaak betreft dit additieven die een direct antiparasitair of antibacterieel effect hebben (direct gericht tegen grampositieve bacteriën in het algemeen of *C. perfringens* in het bijzonder). Herstel betekent bij Aanpak 2: primair herstel van darmintegriteit.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: o.a. bacteriologisch onderzoek.

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichaamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaanniveau te beoordelen.

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Rond dag 9 worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten van *E. maxima*. Dit wekt darmschade op in het jejunum, wat de juiste condities schept voor het laten aanslaan van *C. perfringens*. Dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden oraal geïnoculeerd met fysiologische zoutoplossing.

Ongeveer 5 dagen na de *E. maxima* inoculatie, dus rond dag 14, worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met *C. perfringens*. De dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden geïnoculeerd met steriele leverbouillon. De inoculaties duren ongeveer 3 seconden per dier.

Met dit protocol zijn de effecten van NE het duidelijkst zichtbaar op dag 15 en 16 (d.w.z. 1 en 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie). Deze dagen zijn het meest indicatief om darmlaesiescores uit te voeren. Laesiescores worden uitgevoerd bij 4 dieren per proefeenheid per dag. In totaal worden er dus 8 dieren per proefeenheid gebruikt voor laesiescores.

Van de dieren die geëuthanaseerd worden om de laesiescores uit te voeren, kunnen tegelijkertijd andere monsters verzameld worden, zoals darminhoud voor analyse van de microbiota, darmweefsel voor histologie, bloed voor analyse op antilichamen of acute fase eiwitten, etc. Na dag 16 treedt herstel op. Dit is

af te lezen aan een toenemende voeropname en het verdwijnen van darmschade.

Afhankelijk van het type additief zijn in sommige gevallen op andere dagen dan dag 15 en 16 extra monsternames nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor het meten van de samenstelling van de microflora in de darm, het meten van de verteerbaarheid van voedingsstoffen tijdens en na de herstelfase, of de kinetiek van antilichaamresponsen. Voor het verzamelen van darmmonsters moet het dier geëuthanaseerd worden. Euthanasie of bloedafname duren ongeveer 30 seconden. Deze extra handelingen worden uitgevoerd bij maximaal 3 dieren per hok op maximaal vier tijdstippen. Vanaf inoculatie duurt het een kleine week voordat een antilichaamrespons meetbaar is. Het meten van antilichaamresponsen is bij NE proeven dus niet zinvol bij de dieren die worden geëuthanaseerd op dag 15 en 16 t.b.v. darmscores. Daarom worden de bloedmonsters bij andere dieren genomen als herhaalde waarneming. Dat wil zeggen: steeds dezelfde dieren worden bemonsterd met een tussenpoos van een week.

Afhankelijk van het aantal voerfases worden de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

De periode vanaf de eerste inoculatie (op dag 9) tot aan dag 21 wordt beschouwd als de infectieuze periode. De dieren worden dan tijdelijk gehuisvest op roostervloeren. Dit is om ervoor te zorgen dat de dieren niet geherinfecteerd worden door de nieuwe generatie *Eimeria* oöcysten. Dit zou namelijk interfereren met de *C. perfringens* inoculatie op dag 14, waardoor de infectie ongecontroleerd zou verlopen. Daarvoor en daarna worden de dieren op strooisel gehuisvest.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef heeft een praktijkconforme productieperiode (35-42 dagen) als productieprestaties gedurende de herstelfase een belangrijke responsparameter zijn. Als dat niet het geval is, duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste  $P \leq 0,05$ . Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Necrotische enteritis proeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekst, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuiken aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

Geschatte aantallen:

Aanpak 1 (praktijkconforme productieperiode 35-42 dagen): de proef start met 20 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 2 (proefduur 16-21 dagen): de proef start met 10 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 1: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 20 = 960 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal  $5 \times 3 \times 960 = 14400$  vleeskuikens.

Aanpak 2: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 10 = 480 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 2 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal  $5 \times 2 \times 480 = 4800$  vleeskuikens.

### 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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

De additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. Testproducten die als doel hebben om NE te verminderen, hebben vaak als werkingsmechanisme een antibacteriële activiteit tegen *C. perfringens*. Dit is goed *in vitro* te onderzoeken. De effectiviteit van een testproduct in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab, zeker bij een ziekte als NE, die van meer factoren afhankelijk is dan alleen *C. perfringens*.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn.

NE is een typische vleeskuikenziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

#### Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en

waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

#### Verfijning

Het model is in de loop der jaren verfijnd van drie keer inoculeren met *C. perfringens* naar één keer. In het verleden werden de dieren gedurende de gehele proefperiode op roostervloeren gehuisvest. In het huidige model worden de dieren gedurende slechts 12 dagen op roostervloeren gehuisvest.

Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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.

Alle handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

## **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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

## **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.

De dieren worden bij aankomst gehuisvest op strooisel. Gedurende 12 dagen vanaf de eerste inoculatie worden de dieren op roostervloeren gehuisvest om herinfectie en een ongecontroleerd verloop van de infectie te voorkomen. Huisvesting op roostervloeren gaat ten koste van de mogelijkheid tot stofbaden, maar gemakkelijke toegang tot voer en water en ruimte om te lopen blijft bestaan.

Na deze periode worden de dieren weer op schoon strooisel gehuisvest tot aan het einde van de proef.

De bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd. Het gros van de proeven zal niet langer duren dan 35 dagen. Een dergelijke groeiperiode komt redelijk overeen met de praktijk in Nederland. Er zijn echter regio's, zoals Italië en Spanje, waar het gebruikelijk is om vleeskuikens gedurende een langere groeiperiode aan te houden. In een enkel geval kan het dus voorkomen dat een opdrachtgever expliciet een langere groeiperiode wil. In die gevallen kan het voorkomen dat de bezetting gedurende korte tijd (van dag 37 tot dag 42) iets hoger is dan in de eisen voor proefdieren staat vermeld, namelijk niet de vereiste 0.21 m<sup>2</sup>, maar 0.17 m<sup>2</sup> (alleen indien de dieren een gewicht van 2.4 kg overschrijden). Ondanks de iets hogere bezettingsgraad hebben de dieren dan nog steeds zeer gemakkelijk toegang tot water en voer, en nog steeds de ruimte om te lopen en te stofbaden.

### **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.

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van NE laten zien, zoals lusteloosheid, diarree, bol zitten en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie
- 3) Tijdelijke huisvesting op roostervloeren

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel. De tijdelijke huisvesting op roostervloeren is minder comfortabel dan huisvesting op strooisel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt. Het ongerief door roosterhuisvesting wordt zoveel mogelijk beperkt door deze periode niet langer dan 12 dagen te laten duren en door aangepaste maaswijdtes te gebruiken, afhankelijk van de leeftijd van de dieren.

### 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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verschijnselen als gevolg van NE (sleme dieren, lage voeropname, natte mest), duren meestal 2 à 3

dagen. Daarna zet het herstel in, wat onder andere af te lezen is aan een stijgende lijn in de voeropname en een afname van de darmschade. Proeven met dit model hebben in het verleden laten zien dat 6 dagen na de *Clostridium* inoculatie de darmschade geheel verdwenen is.

Dieren waarbij op de 3e dag na de *Clostridium* inoculatie geen herstel is ingezet, of die ernstige symptomen hebben (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging) waar na 1 dag (dit is 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie) geen verbetering in zit, hebben een humaan eindpunt bereikt en worden geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

### **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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparameter. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd worden.

NE is geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis, hoewel er een kans bestaat op afkeur door leverafwijkingen. Daarnaast gaat het hier om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt. Daarom is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen, en worden de dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd en vernietigd.

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.

X Ja





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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           |
|------------|--------------------------|
| 1          | Infectiemodel coccidiose |

*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.

Het doel van de proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om coccidiose te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na coccidiose te verbeteren. Coccidiose wordt veroorzaakt door Eimeria parasieten.

Eimeria spp. heeft een complexe levenscyclus. Nadat een oöcyste is uitgescheiden, moet deze eerst onder invloed van vocht en warmte in het strooisel sporuleren. Een gesporuleerde oöcyste is het infectieuze stadium. Als deze wordt opgenomen door een kip, komen de parasieten vrij in de darm en dringen daar de darmcellen binnen. In de darmcellen ontwikkelen de parasieten zich verder, totdat ze op een gegeven moment uit de cel barsten. De parasieten dringen dan weer nieuwe darmcellen binnen voor het volgende stadium van hun ontwikkeling totdat ze weer uit de darmcel barsten. Na het doorlopen van een aantal van deze aseksuele ontwikkelingsstadia is er een seksueel stadium waarbij een zygote gevormd wordt. Na omhulling met een celwand wordt gesproken over een oöcyste. Deze oöcyste wordt met de mest uitgescheiden, en de cyclus kan opnieuw beginnen. De periode tussen opname van een gesporuleerde oöcyste en uitscheiding van de nieuwe generatie oöcysten is afhankelijk van de Eimeria species, en kan variëren tussen 4 en 7 dagen. Het algemene klinische beeld van coccidiose is: slome kuikens, ruig verenkleed, slechte uniformiteit in het koppel, natte mest (soms bloederig), onverteerde voerdeeltjes in de mest en slechte groei. Bij sectie van zieke dieren wordt darmschade gevonden.

De belangrijkste Eimeria species voor vleeskuikens staan hieronder genoemd:

- *E. acervulina* is de minst pathogene species, beschadigt voornamelijk het epitheel in het duodenum en heeft een hoge oöcysten-productie. Er is geen tot weinig uitval, maar er is vooral slechtere groei en voederconversie.
- *E. maxima* beschadigt voornamelijk de epitheelcellen van het duodenum en jejunum, produceert

minder oöcysten dan *E. acervulina*, maar kan wel uitval veroorzaken en veel economische schade als gevolg van slechtere groei en voederconversie.

- *E. tenella* beschadigt het epitheel van de blindedarmen, wat dusdanig ernstig kan zijn dat bloederige mest uitgescheiden wordt. De sterfte kan bij een klinische *E. tenella* infectie hoog zijn.

Het coccidiose-infectiemodel wordt vrijwel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door orale inoculatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten.

In de praktijk blijft coccidiose meestal niet beperkt tot één *Eimeria* species. Daarom wordt in het model gekozen voor een menginfectie van de drie hierboven genoemde species, waarbij rekening gehouden wordt met het verschil in pathogeniciteit. Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. Alle dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. Het doel hiervan is dat het verloop van de infectie volledig gecontroleerd wordt, want alle dieren bevinden zich op zeker moment in ongeveer hetzelfde stadium van infectie of herstel.
2. Slechts enkele dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. De geïnoculeerde dieren gaan na ongeveer een week de nieuwe generatie oöcysten uitscheiden die opgenomen kunnen worden door de contactdieren binnen de experimentele eenheid. Een dergelijk transmissie-experiment heeft als doel om een veldinfectie zoveel mogelijk na te bootsen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is. Aanpak 1 is vooral geschikt voor een Proof of Principle of voor een onderzoeksvraag waarbij de variatie in productiestatistiek binnen een experimentele eenheid zo klein mogelijk moet zijn. Aanpak 2 is juist geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij de praktijksituatie het uitgangspunt is, namelijk variatie binnen de contactdieren in een experimentele eenheid wat betreft het tijdstip van besmetting en de infectieuze dosis die het dier uit de omgeving opneemt. Aanpak 2 zal over het algemeen tot meer variatie in productiestatistiek binnen een experimentele eenheid leiden dan aanpak 1.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - namelijk een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Een negatieve controlegroep wordt oraal geïnoculeerd met phosphate buffered saline - PBS - in plaats van *Eimeria spp.* Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: tellen van oöcysten in de mest (OPG = oöcysten per gram).

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaanniveau te beoordelen.

---

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.

---

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Aanpak 1: alle dieren in de proef worden rond dag 18 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ca. 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 3 seconden per dier.

Aanpak 2: ongeveer 20% van het aantal dieren in een experimentele eenheid wordt rond dag 10 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ongeveer 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 15 seconden per dier. Dit zijn seeder dieren. Deze dieren worden gemerkt met een vleugelmerk of pootring. De overige 80% zijn contactdieren, die de infectie na ongeveer een week via de natuurlijke route (namelijk via geïnfecteerde mest) van de geïnoculeerde dieren oppikken. De contactdieren worden dus rond dag 17-18 geïnfecteerd. Op deze manier sluiten beide aanpakken weer op elkaar aan.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef duurt tot de gebruikelijke slachtleeftijd voor vleeskuikens (35-42 dagen). Afhankelijk van het aantal voerfasen worden

de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

Na inoculatie wordt per experimentele eenheid wekelijks mest verzameld voor OPG.

Bij aanpak 1 worden rond dag 6 na inoculatie 3 dieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Deze procedure wordt na een week nog eens herhaald.

Bij aanpak 2 worden rond dag 6 na inoculatie 2 seeders random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Op 7 en 14 dagen na deze procedure worden 3 contactdieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren.

Bij de dieren waarbij darmlaesies gescoord worden, kan tegelijkertijd bloed of (darm)weefsel afgenomen worden voor aanvullend onderzoek.

Afhankelijk van het type additief is in sommige gevallen een extra monsternamen nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor de kinetiek van antilichaamresponsen. Bloedafname duurt ongeveer 30 seconden per dier. Deze extra handeling wordt uitgevoerd bij maximaal 3 random geselecteerde dieren per hok op maximaal twee tijdstippen (eenmaal per week).

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste  $P \leq 0,05$ . Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Coccidioseproeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekest, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuikens aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

### Geschatte aantallen:

Aanpak 1: de proef start met 20 kuikens per proefeenheid.

Aanpak 2: de proef start met 22 kuikens per proefeenheid.

Het verschil in startaantal wordt verklaard door het extra sectiemoment bij Aanpak 2.

Met de aanname dat alle proeven volgens Aanpak 2 worden uitgevoerd, zijn er per proef naar schatting 8

behandelingen x 6 herhalingen x 22 = 1056 dieren. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal 5 x 3 x 1056 = 15840 vleeskuikens.

### 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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

De additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. De effectiviteit in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab. Dit geldt in het bijzonder voor een parasiet als Eimeria, die een complexe levenscyclus heeft die moeilijk *in vitro* is na te bootsen.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn. Coccidiose is een diersoortspecifieke ziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

#### Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

#### Verfijning

De doseringen van Eimeria spp. zijn zodanig dat een milde coccidiose wordt beoogd, met effecten op productieprestaties, maar met zo min mogelijk darmschade, waardoor het ongerief wordt verkleind. Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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.

- Alle handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

## 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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

## 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.

.

### 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.

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

## 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.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van coccidiose laten zien, zoals sloomheid, natte mest en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt.

### 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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verwachte verschijnselen als gevolg van milde coccidiose (sloomheid, natte mest, lagere voeropname) duren meestal enkele dagen. Dieren die langer dan verwacht (meer dan 5 dagen) of ernstiger symptomen hebben dan een milde coccidiose (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging), hebben een humaan eindpunt bereikt en worden onmiddellijk geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

Een tijdige herkenning van humane eindpunten wordt geborgd door bij de dagelijkse controles dieren die bovenstaande ziekteverschijnselen vertonen een kleurmerk te geven. Elke dag van de week heeft een eigen kleurcode om dieren met milde symptomen te merken. Daarnaast wordt één kleur gereserveerd om dieren met ernstiger symptomen te merken. Op deze manier kunnen dieren met milde symptomen in de tijd gevolgd worden, en dieren met ernstiger symptomen snel geïdentificeerd worden. Bij de dierruimtes zijn werkvoorschriften aanwezig die helpen beslissen wanneer een humaan eindpunt is bereikt.

### 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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparemetre. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd

worden.

Coccidiose vormt geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis. Aangezien het hier echter gaat om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt, is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen. Daarom worden dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd.

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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                      |
|------------|-------------------------------------|
| 2          | infectiemodel necrotische enteritis |

*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.

Het doel van de proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om necrotische enteritis (NE) te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na NE te verbeteren. NE wordt veroorzaakt door toxineproducerende *Clostridium perfringens*. Dit is een Grampositieve bacterie die zich in de blindedarmen van pluimvee ophoudt. De bacterie veroorzaakt hier in principe geen schade. Onder bepaalde omstandigheden kan de bacterie uitgroeien op andere plaatsen in de darm, en veroorzaakt dan ernstige darmschade met weefselversterf. Een belangrijke predisponerende factor voor het laten aanslaan van *C. perfringens* is reeds aanwezige darmschade, bijvoorbeeld als gevolg van coccidiose. Ook een verhoogde viscositeit in de darm of een teveel aan onverteerd ruw eiwit zijn uitgesproken risicofactoren voor het ontstaan van NE. Een verhoogde viscositeit zorgt voor een langzamere passagesnelheid van de digesta. Daardoor is er een aanbod van nutriënten in de achterste delen van de darm, waar *C. perfringens* van kan profiteren. Een teveel aan onverteerd ruw eiwit wordt gefermenteerd door de microbiota in de darm. De fermentatieproducten die daarbij ontstaan beschadigen de darm.

De klinische verschijnselen bij de acute vorm zijn bloederige mest en sterfte, die in de praktijk kan oplopen tot 50%. De infectie roept een acute fase respons op die een reductie veroorzaakt in de voeropname en een toename in afbraak van spierweefsel. Bij sectie worden ernstige darmbeschadigingen gevonden. In de subklinische vorm zijn de kuikens traag en vertonen een achterblijvende productie (m.n. verlaagde voeropname en groei), maar de sterfte hoeft niet verhoogd te zijn; het koppel als geheel wordt ongelijkmatig.

Vroege verschijnselen van NE zijn natte mest, diarree en nat strooisel. Zowel in de acute vorm als in de subklinische vorm kan het percentage afkeuringen bij de slacht als gevolg van leverafwijkingen hoog zijn. Een uitbraak van NE maakt in de praktijk een behandeling met antibiotica noodzakelijk.



Aangezien NE een typische vleeskuikenziekte is, wordt het NE-infectiemodel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door een combinatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten en *C. perfringens* bacteriën.

Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. De testproducten worden onderzocht op de effecten op darmniveau en op productieprestaties. Dit betekent dat de dieren gedurende een periode van 35 tot 42 dagen worden gevolgd. Deze periode komt overeen met de praktijk.
2. De testproducten worden alleen onderzocht op de effecten op darmniveau. In dat geval duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is.

Aanpak 1 is geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van primair belang is. Deze additieven beogen vaak al in de periode voorafgaand aan de infectie een zodanig effect op het dier en/of in de darm te hebben, dat de infectie minder gemakkelijk aanslaat, of waarbij het dier na de infectie sneller herstelt. Herstel betekent bij Aanpak 1 niet alleen herstel van de darmintegriteit, maar ook herstel van de voeropname en groei.

Aanpak 2 is vooral geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van ondergeschikt belang is. Vaak betreft dit additieven die een direct antiparasitair of antibacterieel effect hebben (direct gericht tegen grampositieve bacteriën in het algemeen of *C. perfringens* in het bijzonder). Herstel betekent bij Aanpak 2: primair herstel van darmintegriteit.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: o.a. bacteriologisch onderzoek.

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichaamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaanniveau te beoordelen.

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Rond dag 9 worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten van *E. maxima*. Dit wekt darmschade op in het jejunum, wat de juiste condities schept voor het laten aanslaan van *C. perfringens*. Dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden oraal geïnoculeerd met fysiologische zoutoplossing.

Ongeveer 5 dagen na de *E. maxima* inoculatie, dus rond dag 14, worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met *C. perfringens*. De dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden geïnoculeerd met steriele leverbouillon. De inoculaties duren ongeveer 3 seconden per dier.

Met dit protocol zijn de effecten van NE het duidelijkst zichtbaar op dag 15 en 16 (d.w.z. 1 en 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie). Deze dagen zijn het meest indicatief om darmlaesiescores uit te voeren. Laesiescores worden uitgevoerd bij 4 dieren per proefeenheid per dag. In totaal worden er dus 8 dieren per proefeenheid gebruikt voor laesiescores.

Van de dieren die geëuthanaseerd worden om de laesiescores uit te voeren, kunnen tegelijkertijd andere monsters verzameld worden, zoals darminhoud voor analyse van de microbiota, darmweefsel voor histologie, bloed voor analyse op antilichamen of acute fase eiwitten, etc. Na dag 16 treedt herstel op. Dit is

af te lezen aan een toenemende voeropname en het verdwijnen van darmschade.

Afhankelijk van het type additief zijn in sommige gevallen op andere dagen dan dag 15 en 16 extra monsternames nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor het meten van de samenstelling van de microflora in de darm, het meten van de verteerbaarheid van voedingsstoffen tijdens en na de herstelfase, of de kinetiek van antilichaamresponsen. Voor het verzamelen van darmmonsters moet het dier geëuthanaseerd worden. Euthanasie of bloedafname duren ongeveer 30 seconden. Deze extra handelingen worden uitgevoerd bij maximaal 3 dieren per hok op maximaal vier tijdstippen. Vanaf inoculatie duurt het een kleine week voordat een antilichaamrespons meetbaar is. Het meten van antilichaamresponsen is bij NE proeven dus niet zinvol bij de dieren die worden geëuthanaseerd op dag 15 en 16 t.b.v. darmscores. Daarom worden de bloedmonsters bij andere dieren genomen als herhaalde waarneming. Dat wil zeggen: steeds dezelfde dieren worden bemonsterd met een tussenpoos van een week.

Afhankelijk van het aantal voerfases worden de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

De periode vanaf de eerste inoculatie (op dag 9) tot aan dag 21 wordt beschouwd als de infectieuze periode. De dieren worden dan tijdelijk gehuisvest op roostervloeren. Dit is om ervoor te zorgen dat de dieren niet geherinfecteerd worden door de nieuwe generatie *Eimeria* oöcysten. Dit zou namelijk interfereren met de *C. perfringens* inoculatie op dag 14, waardoor de infectie ongecontroleerd zou verlopen. Daarvoor en daarna worden de dieren op strooisel gehuisvest.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef heeft een praktijkconforme productieperiode (35-42 dagen) als productieprestaties gedurende de herstelfase een belangrijke responsparameter zijn. Als dat niet het geval is, duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste  $P \leq 0,05$ . Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Necrotische enteritis proeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekest, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuiken aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

Geschatte aantallen:

Aanpak 1 (praktijkconforme productieperiode 35-42 dagen): de proef start met 20 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 2 (proefduur 16-21 dagen): de proef start met 10 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 1: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 20 = 960 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal  $5 \times 3 \times 960 = 14400$  vleeskuikens.

Aanpak 2: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 10 = 480 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 2 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal  $5 \times 2 \times 480 = 4800$  vleeskuikens.

### 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 welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

De additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. Testproducten die als doel hebben om NE te verminderen, hebben vaak als werkingsmechanisme een antibacteriële activiteit tegen *C. perfringens*. Dit is goed *in vitro* te onderzoeken. De effectiviteit van een testproduct in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab, zeker bij een ziekte als NE, die van meer factoren afhankelijk is dan alleen *C. perfringens*.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn.

NE is een typische vleeskuikenziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

#### Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en

waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

#### Verfijning

Het model is in de loop der jaren verfijnd van drie keer inoculeren met *C. perfringens* naar één keer. In het verleden werden de dieren gedurende de gehele proefperiode op roostervloeren gehuisvest. In het huidige model worden de dieren gedurende slechts 12 dagen op roostervloeren gehuisvest.

Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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.

Alle handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

## **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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

## **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.

De dieren worden bij aankomst gehuisvest op strooisel. Gedurende 12 dagen vanaf de eerste inoculatie worden de dieren op roostervloeren gehuisvest om herinfectie en een ongecontroleerd verloop van de infectie te voorkomen. Huisvesting op roostervloeren gaat ten koste van de mogelijkheid tot stofbaden, maar gemakkelijke toegang tot voer en water en ruimte om te lopen blijft bestaan.

Na deze periode worden de dieren weer op schoon strooisel gehuisvest tot aan het einde van de proef.

De bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd. Het gros van de proeven zal niet langer duren dan 35 dagen. Een dergelijke groeiperiode komt redelijk overeen met de praktijk in Nederland. Er zijn echter regio's, zoals Italië en Spanje, waar het gebruikelijk is om vleeskuikens gedurende een langere groeiperiode aan te houden. In een enkel geval kan het dus voorkomen dat een opdrachtgever expliciet een langere groeiperiode wil. In die gevallen kan het voorkomen dat de bezetting gedurende korte tijd (van dag 37 tot dag 42) iets hoger is dan in de eisen voor proefdieren staat vermeld, namelijk niet de vereiste 0.21 m<sup>2</sup>, maar 0.17 m<sup>2</sup> (alleen indien de dieren een gewicht van 2.4 kg overschrijden). Ondanks de iets hogere bezettingsgraad hebben de dieren dan nog steeds zeer gemakkelijk toegang tot water en voer, en nog steeds de ruimte om te lopen en te stofbaden.

### **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.

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van NE laten zien, zoals lusteloosheid, diarree, bol zitten en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie
- 3) Tijdelijke huisvesting op roostervloeren

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel. De tijdelijke huisvesting op roostervloeren is minder comfortabel dan huisvesting op strooisel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt. Het ongerief door roosterhuisvesting wordt zoveel mogelijk beperkt door deze periode niet langer dan 12 dagen te laten duren en door aangepaste maaswijdtes te gebruiken, afhankelijk van de leeftijd van de dieren.

### 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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verschijnselen als gevolg van NE (sleme dieren, lage voeropname, natte mest), duren meestal 2 à 3

dagen. Daarna zet het herstel in, wat onder andere af te lezen is aan een stijgende lijn in de voeropname en een afname van de darmschade. Proeven met dit model hebben in het verleden laten zien dat 6 dagen na de *Clostridium* inoculatie de darmschade geheel verdwenen is.

Dieren waarbij op de 3e dag na de *Clostridium* inoculatie geen herstel is ingezet, of die ernstige symptomen hebben (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging) waar na 1 dag (dit is 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie) geen verbetering in zit, hebben een humaan eindpunt bereikt en worden geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

Een tijdige herkenning van humane eindpunten wordt geborgd door bij de dagelijkse controles dieren die bovenstaande ziekteverschijnselen vertonen een kleurmerk te geven. Elke dag van de week heeft een eigen kleurcode om dieren met milde symptomen te merken. Daarnaast wordt één kleur gereserveerd om dieren met ernstiger symptomen te merken. Op deze manier kunnen dieren met milde symptomen in de tijd gevolgd worden, en dieren met ernstiger symptomen snel geïdentificeerd worden. Bij de dierruimtes zijn werkvoorschriften aanwezig die helpen beslissen wanneer een humaan eindpunt is bereikt.

### 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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparameter. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd worden.

NE is geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis, hoewel er een kans bestaat op afkeur door leverafwijkingen. Daarnaast gaat het hier om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt. Daarom is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen, en worden de dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd en vernietigd.

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.

X Ja

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD246002016766**
2. Titel van het project: Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee
3. Titel van de NTS: Verbeteren van darmgezondheid in pluimvee
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-WUR  
[REDACTED]  
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 8-12-2016  
Aanvraag compleet: ja  
In vergadering besproken: 19-12-2016  
Anderszins behandeld:  
Termijnonderbreking(en) van 31-12-2016 tot 12-01-2017 en van 17-01-2017 tot 26-01-2017  
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.  
Aanpassing aanvraag: 12-01-2017  
Advies aan CCD: 27-01-2017
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 31-12-2016  
Gestelde vragen *en antwoorden*:  
M.b.t. beide appendices:  
De onderzoekers geven bij A (Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters) aan, dat ze een tweezijdige test uitvoert. Het is de DEC niet duidelijk, waarom dit niet eenzijdig kan, aangezien ze op zoek zijn naar een positief effect van de teststoffen en zij verzoekt dit nader toe te lichten.  
*Van de te onderzoeken teststoffen wordt inderdaad een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.*  
Bovendien vraagt de DEC zich af, of het percentage, dat de humane eindpunten bereikt (J) geen onderschatting is, aangezien dit er van uit lijkt te gaan, dat de te testen middelen inderdaad effectief zijn en zij verzoekt de onderzoekers hier op in te gaan.  
*De criteria van de humane eindpunten zijn geformuleerd in de wetenschap dat de geïnfecteerde dieren ziekteverschijnselen kunnen gaan vertonen, maar ook goede kans hebben om te herstellen, zelfs in de positieve controlegroep (d.w.z.*

*geïnfecteerd, maar geen teststof ontvangen). Om een schatting te doen van het percentage dieren dat geen uitzicht heeft op herstel en zo een humaan eindpunt bereikt, ben ik juist uitgegaan van een maximum: verondersteld dat alle dieren in de positieve controle een humaan eindpunt bereiken, is dat  $(1 \text{ behandeling} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) / (8 \text{ behandelingen} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) = 120/960 = 12.5\%$  (afgerond 13%). Zie voor de aantallen onderdeel B van de appendices. Deze schatting is eerder aan de hoge kant dan aan de lage kant. Zouden we uitgaan van een scenario van 2 humane eindpunten per kooi, dan wordt de berekening  $(7 \text{ geïnfecteerde behandelingen per proef} \times 6 \text{ herhalingen} \times 2 \text{ dieren}) / (8 \text{ behandelingen} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) = 84/960 = 8.75\%$  (afgerond 9%). Ik verwacht dat het percentage van 13% zoals genoemd in de appendices daarom geen onderschatting is.*

Daarnaast is het de DEC niet duidelijk, waarop het percentage van de dieren dat licht ongerief ondergaat is gebaseerd (13% volgens de NTS) en zij verzoekt dit bij K. (classificatie van ongerief) nader toe te lichten.

*Het percentage dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn, waarvan eentje dus de negatieve controle is (d.w.z. niet geïnfecteerd en geen teststof ontvangen), is dat  $(1 \text{ behandeling} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) / (8 \text{ behandelingen} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) = 120/960 = 12.5\%$  (afgerond 13%) van het aantal dieren. Bij proeven met minder proefgroepen of met een factoriële opzet (waarbij de teststof ook wordt toegepast bij dieren die niet geïnfecteerd worden), wordt het aandeel dieren met licht ongerief groter en met matig ongerief kleiner.*

M.b.t. Appendix 2:

De onderzoekers geven bij F. aan dat de bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd en dat het gros van de proeven niet langer duren dan 37 dagen. Het is de DEC niet duidelijk, waarom het in die gevallen nodig is om voor één dag af te wijken van de proefdiernorm en verzoekt hen dit te beargumenteren.

*Dit betreft een ongelukkige typefout. Het gros van de proeven duurt niet langer dan 35 dagen. Een groeiperiode van 35 dagen komt redelijk overeen met de praktijk in Nederland. Er zijn echter regio's, zoals Italië en Spanje, waar het gebruikelijk is om vleeskuikens gedurende een langere groeiperiode aan te houden. In een enkel geval kan het dus voorkomen dat een opdrachtgever expliciet een langere groeiperiode wil.*

*In die gevallen is de minimale oppervlakte per dier niet de vereiste  $0.21 \text{ m}^2$ , maar  $0.17 \text{ m}^2$ .*

M.b.t. de NTS:

De DEC verzoekt u bij 3.5. de bloedafname en het nemen van weefselmonsters te verwijderen, aangezien dit post mortem zal plaatsvinden.

*Onderdeel 3.5: Het nemen van weefselmonsters is verwijderd uit de NTS. Het nemen van bloedmonsters niet, omdat er soms aanvullende monsternamen nodig is, zoals beschreven bij onderdeel A: beschrijving van de behandeling. Ik denk dat het daarom juister is om bloedafname in de NTS te laten staan.*

Tot slot verzoekt de DEC de NTS zo nodig aan te passen conform aanpassingen in de appendices.

*Dit is aangepast*

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. Het betreft een nieuwe aanvraag.



3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

### **C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Er wordt een methode gehanteerd met telkens dezelfde aanpak voor het onderzoeken van hetzelfde doel. De experimenten die worden uitgevoerd hangen onderling niet samen. Het gaat om verschillende middelen, waarvan de verwachting is, dat ze een onderdrukkende werking hebben op de betreffende ziekte(n), die wel een verschillend aangrijpingspunt kunnen hebben. Het feit dat er ook farmaceutische middelen worden onderzocht (met mogelijk een ander type werking, een potentere impact) heeft geen invloed op de beoordeling van de samenhang in dit project. Het is voor de DEC niet mogelijk de waarschijnlijkheid te beoordelen, dat de toegediende middelen effectief zijn. De stoffen zijn al wel in vitro getest. Dit project past binnen de CRO-regeling die er met de CCD is afgesproken.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van de aanvraag is het onderzoeken van de effecten van voederadditieven op twee infectieuze darmmodellen.  
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het onderdrukken van infectieziekten in de vleeskuikenhouderij en daardoor verbeteren van de groei (voederconversie) en het welzijn van vleeskuikens.  
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
  - Proefdieren: aantasting van welzijn door darmbeschadigingen, het toedienen van ziekteverwekkers via de bek, bloedafname en het wegen van de dieren;
  - Doeldieren: verbeterde darmgezondheid en daarmee een bijdrage aan de algehele gezondheid van het dier;
  - Veehouder: economisch belang, vermindering van de afwijzing van deze vorm van bio-industrie ("licence to produce");
  - Veevoerfabrikant: economisch belang;
  - Onderzoeker/CRO: economisch belang;
  - Consumenten/ burgers: minder antibioticumgebruik.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Het onderzoeksinstituut is een onafhankelijk privaat kennis- en informatiecentrum voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om de geformuleerde onderzoeksvragen te beantwoorden, evenals specifieke en gestandaardiseerde modellen om milde infecties na te bootsen. Het instituut heeft zeer veel ervaring met het uitvoeren van dit type studies en relevante expertises (kennis van dierfysiologie, darmgezondheid, microbiologie, grondstoffen, voeradditieven, ervaring met het uitvoeren van infectieproeven en de daarbij behorende eisen aan monsternamen). Daarnaast heeft het dierfaciliteiten

en specifieke en gestandaardiseerde modellen die geschikt zijn voor het uitvoeren van de onderzoeksvragen in dit project, het heeft een vaste groep gekwalificeerde en ervaren onderzoekers, diervverzorgers en andere betrokkenen in dienst. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan deze projecten, waardoor de voortgang van het project is gewaarborgd.

8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven opzet en de ervaring heeft geleerd dat het haalbaar is.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: Er wordt geen verdoving/pijnbestrijding toegepast. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Gedurende 12 dagen vanaf de eerste inoculatie worden de dieren op roostervloeren gehuisvest om herinfectie en een ongecontroleerd verloop van de infectie te voorkomen. Gemakkelijke toegang tot voer en water en ruimte om te lopen blijft bestaan. Na deze periode worden de dieren weer op schoon strooisel gehuisvest tot aan het einde van de proef. De bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd. De meeste proeven duren niet langer dan 35 dagen. In een enkel geval is de bezetting gedurende korte tijd (van dag 37 tot 42) iets hoger dan in de eisen voor proefdieren staat vermeld. Ook dan hebben de dieren nog steeds zeer gemakkelijk toegang tot water en voer en de ruimte om te lopen en te stofbaden. De DEC acht deze argumentatie afdoende.
11. De DEC stelt vast dat het ongerief als "licht" en in sommige gevallen als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) last hebben van sloomheid, natte mest en een lagere voeropname. Daarnaast kan er sprake zijn van stress door het hanteren. De orale inoculatie, de roosterhuisvesting, de bloedmonstername, darmbeschadigingen, het toedienen van ziekteverwekkers via de bek, bloedafname en het herhaaldelijk wegen van de dieren kunnen ongerief met zich meebrengen.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. Per infectietype is dit verschillend omschreven. Dieren die langer of in ernstiger mate dan verwacht symptomen hebben van de infectie worden onmiddellijk geëuthanaseerd.  
Vooral de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

#### *3 V's*

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Voer- en drinkwateradditieven kunnen in een voortraject met laboratoriumtechnieken onderzocht worden, maar voor de uiteindelijke toepassing in de praktijk is het nodig om de effecten van bijvoorbeeld dosering en voertechnologie in het doeldier te onderzoeken, zoals de effecten op groei en voeropname. Het effect van speciale herstelvoeders op darmgezondheid kan niet in een laboratorium onderzocht worden. Ook het feit dat vleeskuikens speciale eisen stellen aan het voer, maakt dat het nodig is om dit project in het doeldier uit te voeren.

15. De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC zien geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast. Er wordt een milde stam gebruikt, bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd na euthanasie.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

17. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Dit type infectieproeven wordt meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen.
18. Een deel van de dieren wordt gedood in het kader van het project, aangezien er darmlaesies moeten worden onderzocht. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

*NTS*

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

**D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het onderzoeken van de effecten van voederadditieven op twee infectieuze darmmodellen met als uiteindelijke doel het onderdrukken van infectieziekten in de vleeskuikenhouderij en daardoor verbeteren van de groei (voederconversie) en het welzijn van vleeskuikens op tegen het gebruik van de proefdieren, dat gepaard gaat met licht tot matig ongerief?
2. Bij de beoordeling van het doel heeft de DEC in overweging genomen dat darmgezondheid een essentieel onderdeel is van de algehele gezondheid van pluimvee. Als het project zijn uiteindelijke doel bereikt, zal dit voor de dieren in de houderij van substantieel belang zijn. De waarden van welzijn en gezondheid spelen in dat geval. De ziekten worden niet uitgebannen. Het project beoogt echter om via verbeterde darmgezondheid bij te dragen aan een verbeterde weerstand. Hierdoor is ook sprake van een reëel belang voor de pluimveehouders. Het gaat hierbij voornamelijk om een economische waarde. Dit geldt eveneens voor de veevoederindustrie en de onderzoekers/ CRO. Ook de maatschappij en de consumenten zullen in dat geval een gering voordeel hebben, met name in verband met het verminderen van de negatieve effecten van de intensieve dierhouderij, aangezien een verbeterde diergezondheid ook in hun belang is, bv. in het kader van antibioticaresistentie.  
Tot slot zijn er waarden voor de proefdieren in het geding. Er is sprake van maximaal matige welzijnsaantasting door darmbeschadigingen, het oraal toedienen van ziekteverwekkers, bloedafname en het wegemen van de dieren. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
3. De DEC heeft in haar afweging betrokken dat er sprake is van een project dat een samenhangend geheel betreft. Gezien de opzet is de DEC van mening dat het directe en uiteindelijke doel haalbaar zijn en dat dit onderzoek kan bijdragen aan de belangen en waarden zoals hierboven genoemd. De DEC is van mening dat het doel en de daarmee verbonden waarden het geringe/ matige ongerief voor de proefdieren rechtvaardigen en dat er in dit stadium geen mogelijkheden zijn op het terrein van vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

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

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden:

Afstemming

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Onderstaande dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

De DEC heeft de aanvraag besproken binnen de context: Het probleem wordt voor een deel veroorzaakt door het feit dat kippen intensief worden gehouden. Het project richt zich op het compenseren van de negatieve effecten daarvan. De noodzaak daartoe zou minder zijn bij een lagere bezetting en bij langzaam groeiende dieren. De DEC is zich terdege bewust van de gevolgen die de huidige intensieve veehouderij met zich meebrengt en zij neemt dat mee in haar ethische afweging. De DEC is van mening dat het welzijn van de dieren in de intensieve veehouderij onder druk staat en dat onderzoek een bijdrage moet leveren aan het verbeteren van de leefomstandigheden van de dieren. In de aanpak van dit project ziet de DEC mogelijkheden dat hier een bijdrage aangeleverd wordt. De DEC ziet geen directe verantwoordelijkheid voor zichzelf om te sturen op de keuze voor de strategie voor het verbeteren van diergezondheid en dierenwelzijn aangezien die al plaatsvindt voor de indiening van het project. Zij kan in dit kader enkel signaleren. Vanuit dit perspectief heeft de DEC dit project beoordeeld: gegeven de huidige omstandigheden is de DEC van mening dat het project een bijdrage kan leveren aan het verbeteren van het welzijn (inclusief gezondheid) van de dieren. In de ogen van de DEC zijn de dierproeven niet gericht op een praktijk waarbij het welzijn van de dieren zodanig beïnvloed wordt dat dit intrinsiek tot schade aan de dieren leidt. De DEC ziet dit soort projecten juist als een stap naar mogelijke verbetering binnen de huidige veehouderij. De discussie over de wenselijkheid van die veehouderijomstandigheden zal in een ander gremium dan de DEC gevoerd moeten worden.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD246002016766

**Bijlagen**

2

Datum 8 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 december 2016. Het gaat om uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD246002016766. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Factuur**

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

8 december 2016

**Aanvraagnummer:**

AVD246002016766

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
8 december 2016  
**Aanvraagnummer:**  
AVD246002016766

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 24600  
Naam instelling of organisatie: Schothorst Feed Research BV  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 39084732  
Straat en huisnummer: Meerkoetenweg 26  
Postbus: 533  
Postcode en plaats: 8200 AM LELYSTAD  
IBAN: NL24RABO0337738394  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Schothorst Feed Research B.V.

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Onderzoeker [REDACTED]  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Datum:**  
8 december 2016  
**Aanvraagnummer:**  
AVD246002016766

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████  
Functie: Onderzoeker ██████████  
Afdeling: ██████████  
Telefoonnummer: ██████████  
E-mailadres: ██████████

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2017  
Geplande einddatum: 1 januari 2022  
Titel project: Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee  
Titel niet-technische samenvatting: Verbeteren van darmgezondheid in pluimvee  
Naam DEC: DEC Wageningen UR  
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen  
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.187,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting



**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Plaats: Lelystad

Datum: 6 december 2016

**Datum:**

8 december 2016

**Aanvraagnummer:**

AVD246002016766



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD246002016766

**Bijlagen**

2

Datum 8 december 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 8 december 2016

Vervaldatum: 7 januari 2017

Factuurnummer: 16700766

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD246002016766	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



10.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD246002016766

Datum 20 februari 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 7 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD246002016766. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

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

### **Onduidelijkheden**

De dieren in de positieve controle lopen kans een humaan eindpunt te bereiken. Hoe borgt u dat humane eindpunten tijdig worden herkend en ernstig ongerief wordt voorkomen?

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Wanneer een beslissing**

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

**Datum:**

20 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

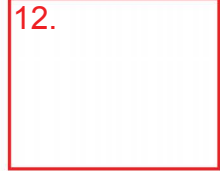
AVD246002016766

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV



Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD246002016766

**Bijlagen**

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 7 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD246002016766. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 22 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. In Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 is beschreven hoe de humane eindpunten tijdig worden herkend.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 1 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 januari 2017. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

**Datum:**  
1 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD246002016766

#### **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 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
M. G. de Feiter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Schothorst Feed Research BV  
Adres: Postbus 533  
Postcode en plaats: 8200 AM LELYSTAD  
Deelnemersnummer: 24600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD246002016766, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2017, ontvangen op 27 januari 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 22 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Infectiemodel coccidiose</b>				
	Kippen / vleeskuikens	15.840	88% Matig 12% Licht	
<b>3.4.4.2 infectiemodel necrotische enteritis</b>				
	Kippen / vleeskuikens	19.200	88% Matig 12% Licht	

**Aanvraagnummer:**

AVD246002016766

**Voorwaarden**

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welk soort testproduct, welke type dierproef, de wijze van uitvoering en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.





**Aanvraagnummer:**  
AVD246002016766

## 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 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

**Aanvraagnummer:**

AVD246002016766

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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.