		Inventaris Wob-verzoek W17-12								
			wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.		**document NTS 20171646**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1		Origineel aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel				x			x	
4		Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5		Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6		Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8		Dec-advies				x		x	x	
9		Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
10		Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
11		Adviesnota CCD		x						x
12		Beschikking en vergunning				x		x	x	

22000 2017 1646

1.

Centrale Commissie Dierproeven

09 MEI 2017

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. of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 22000
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Provimi BV
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	24131527
Straat en huisnummer	[redacted]
Postbus	
Postcode en plaats	[redacted]
IBAN	NL39RABO0300028598
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Provimi BV

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	Research Scientist	
Afdeling	SMT R&D	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

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

(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 7 - 2017
		Einddatum	30 - 6 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Screening van voedingsstrategieën door middel van het gebruik van fysiologische parameters gericht op het verbeteren van darmgezondheid in varkens	
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	Postbus 9101 6700 HB Wageningen
		E-mailadres	dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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 [redacted]

Datum

Handtekeni [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22000
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV
1.3	Provide the title of the project.	Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs

2 Categories

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

- ☐ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☐ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries
- ☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

The project '*Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs*' aims to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Nutritional solutions are developed based upon (1) identification

of ingredients and additives that improve pig performance through improved gut health, and (2) identification of physiological parameters (biomarkers) that give an indication of gut health and immune status of the pigs. The effects of nutritional solutions on gut health are expected to be better understood through the identification of biomarkers.

Gut health

Research in production animals is focusing more and more on maintaining gut health, with the ban on antibiotic growth promotors and general reduction of antibiotic usage being some of the main drivers. Gut health can be defined as "A steady state where the microbiome and the intestinal tract exist in symbiotic equilibrium and where the welfare and performance of the animal is not constrained by intestinal dysfunction" [1]. This definition combines the main factors determining gut health, which are diet, barrier function of the gastrointestinal tract (GIT) and balanced microbiota, together with effective digestion and absorption of feed, and effective immune status.

Most *in vivo* feed-intervention studies performed today measure standard performance parameters; feed intake, growth and general health status. This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Several studies indicate that dietary solutions directly or indirectly influence gut health. This is hypothesized to be happening through one or more of the following mechanisms: (1) feeding the cells of the immune system, (2) providing substrate for pathogens, (3) modifying the responses of leukocytes, (4) protecting against immunopathology, (5) influencing the microbiota composition of the gut, and (6) stimulating the immune system [2]. However, many questions still remain unanswered in this area. It appears that the detailed mechanisms and modes of action of intestinal structural and functional alterations first need to be better understood in order to develop new dietary solutions.

Relation between gut health and performance

Stress induced by environmental conditions or challenges by feed ingredients can influence gut health. At weaning, the young pig is challenged with separation from the sow, transportation, change of the diet and new pen mates, all of which may result in low voluntary feed intake, reduced performance and increased susceptibility to intestinal infections [3]. Additionally, the digestibility of feed is compromised just after weaning due to insufficient production of enzymes and sub optimal conditions for the enzymes to be fully activated. Because of the fast, right after weaning, a new microbial community is re-established in which Lactobacilli decrease considerably, whereas potentially pathogenic bacteria (e.g. Coliforms) increase [4]. This causes pigs to become more susceptible to overgrowth of potentially pathogenic bacteria such as *E. coli* [5]. Also intestinal morphology changes after weaning. The intestinal villi length has consistently been reported in literature to decrease, which is correlated with decreased feed intake post weaning [6].

Research to piglet performance post weaning used to be focused on the period after weaning, when the actual problems are occurring. However, it is becoming apparent that especially parturition and the immediate period after birth are important for microbial colonization of the gut and development of the GIT of the piglets [7]. Due to this development, research is expanding to the period before weaning, instead of only the period after weaning. This is including effect of sow nutrition during gestation and lactation on the piglets, and the effect of creep feed on the piglets.

Gut health is not only of relevance for young pigs, but also for finisher pigs. In finishers, a healthy gut can contribute to improved efficiency. Related to this is the interest in carry-over effect from nursery until finishing. Recent literature showed that dietary nursery treatments could affect performance in the later life of the pig [8]. This effect may be modulated by development of gut health in early life.

The use of biomarkers

This project is based on previous work that we performed within this area. We have already developed a chip that can measure microbiota in poultry. The microbiota detected on the chip were specifically identified as microbiota important for the health or growth of poultry. The database that was developed for poultry can be applied to create biomarkers for pigs to get more insight into the way nutrition is affecting gut health. This does not necessarily have to be done with microbiota data, but can also be

used for other gut health related biomarkers (e.g. cytokines, acute phase proteins). A different example of the work we have established so far in this area is the finding of a correlation between [redacted] and individual feed intake of weaned pigs. The use of such information can help us in the understanding of gut health by characterizing interactions between diet, structure and function of the GIT, microbiota, digestive function and immune status. In addition to that, we expect that ultimately these biomarkers can be applied for prediction of performance and detection of health issues, both in research setting and farm conditions.

The current project is different from other projects of parties working on the improvement of gut health in pigs, as research is not restricted to the post-weaning phase only. Other parties (companies and universities) and previous research have mainly focused on the period after weaning, when the main problems caused by impaired gut health are occurring. In our research facilities, we have the capability to monitor pigs in different life stages independently, but we can also follow them during later stages. In addition, we measure biomarkers not only as outcome parameter, but also with the aim to generate a robust database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of gut health and performance. Therefore, the current project contributes to the ongoing development of knowledge on gut health of pigs.

References:

1. Van der Aar, P.J., Molist, F., Van der Klis, J.D. (2016). The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. Animal feed science and Technology. *Accepted manuscript*.
2. Klasing, K.C. (2007). Nutrition and the immune system. British Poultry Science 48: 529-537.
3. Campbell, J.M., Crenshaw, J.D., Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. Journal of Animal Science and Biotechnology, 4 (19),
4. Heo, J., Opapeju, F., Pluske, J., Kim, J., Hampson, D., & Nyachoti, C. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 97, 207-237.
5. Pluske, J.R., Pethick, D., Hopwood, D., & Hampson, D. (2002). Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. Nutrition Research Reviews, 15, 333-371.
6. Pluske, J.R., Hampson, D.J., & Williams, I.H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. Livestock Production Science, 51, 215-236.
7. Thompson, C.L., Wang, B., Holmes, A.J. (2008). The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. The ISME Journal, 2, 739-748.
8. Skinner, L.D., Levesque, C.L., Wey, D., Rudar, M., Zhu, J., Hooda, S., de Lange, C.F.M. (2014). Impact of nursery feeding program on subsequent growth performance, carcass quality, meat quality, and physical and chemical body composition of growing-finishing pigs. Journal of Animal Science, 92, 1044-1054.

3.2 Purpose

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

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

The research group conducting the trials within this project has the appropriate expertise to guarantee the best outcome. The responsible applicant of the current project is a scientifically trained employee, actively conducting research since 2015. Next to the applicant, the project team consists of experts with

MSc or PhD degrees in relevant disciplines and experience in this specific research area.

3.3 Relevance

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

The major societal challenge addressed in this project is to work towards a socially accepted form of livestock production in the Netherlands by means of lowered antibiotics usage, lower impact on the environment, and improved animal health and welfare. Preventing the use of antibiotics is not only achieved by developing pre- and pro-biotic additives, but also by improving gut health of animals to make them less susceptible to pathogens.

Application and validation of new technologies and new uses of established technology (e.g. metabolomics, 16S sequencing, clinical blood markers) will make an important contribution to the understanding, prediction and control of immunological and physiological processes in swine.

3.4 Research strategy

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

The studies within this project aim to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. The effects of nutritional solutions on gut health are expected to be better understood through the identification of biomarkers. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as (fermentable) protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next, adequate feed intake before and after weaning is crucial for good gut health. Therefore, also nutritional interventions stimulating feed intake will be tested in the scope of this project. Examples can be the use of flavors, different physical feed forms and compounds affecting mineral balance. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

Most research that studied the effect of nutritional solutions on swine gut health has been performed in the period right after weaning, because this is the period in which most problems occur related to impaired gut health. However, it is becoming more and more apparent that the period before weaning is crucial for development of the gut, and that early nutrition is affecting performance and health in the later life of the pig, up to slaughter. Therefore, in the current project we will consider the entire life span of the pig. This creates the need to perform animal studies mainly with nursery pigs, but also with sows, neonatal and finisher pigs, as well as combinations of these phases. In all of these trials, besides performance and general health, biomarkers will be investigated that are potentially associated with gut health and the quality of the immune response. This requires the collection of blood, tissue, faecal and urine samples.

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

The main components of the project are:
1) Selection of nutritional compounds to be tested.
Literature and internal data will be reviewed in order to list possible candidates to be tested. A selection is made from this list, and the main selection criterion will be an improvement in performance through an improvement of gut health. However, we will also select solutions and/or additives of which no (relevant) in vivo data exists yet, but that do show interesting results in vitro. Next to that, solutions and/ or additives may be selected based on a promising hypothesis of their effect on gut health.

2) Development of experimental program and animal trial execution.
The studies within this project aim to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. The project mainly consists of studies evaluating the effect of nutritional solutions and/ or additives on gut health of nursery pigs. However, of certain solutions it is hypothesized that they stimulate gastro-intestinal development of pigs already before weaning. These may be provided to the sow or the piglets themselves before weaning. Gut health of finisher pigs might also be modulated by providing them nutritional solutions during the finisher period. This requires feeding trials in the finisher phase as well, starting at ~25 kg body weight until approximately 115 kg. In these trials, nutritional solutions can be provided during the finisher phase, or carry-over effects of

treatments in earlier life can be investigated.

In our facilities, health status of the pigs is aimed to be at a high level. Based on literature and nursery studies executed in this project, we aim to identify nutritional solutions and/ or additives that will reduce infection or modulate gastrointestinal microbial response in pigs. Some of these compounds might be more beneficial to the gastrointestinal environment of pigs during a stressful event, such as a pathogen challenge. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection is one of the most important causes of post-weaning diarrhea in pigs. Therefore, *E. coli* challenge in nursery pigs will be selectively used in this project.

In these animal studies, several procedures will be performed to obtain information on the effect of the nutritional solutions and/ or additives on gut health of the pigs. Pigs will be weighed and their intake will be measured at several time points during the trial in order to conclude on effects on general performance. Additionally, several procedures will be part of this project: blood and tissue collection, individual housing, fecal and urinary collection via colostomy bags, feed deprivation for max 24 h and *E. coli* challenge. These procedures will only be performed in pigs after weaning, except for the blood and tissue collections. Blood and tissue collections can be performed in sows, pigs before and after weaning, and finisher pigs.

3) Evaluation of the effect of the different tested nutritional solutions and/or additives on gut health, and evaluation of relevance of biomarkers related to gut health.
This evaluation will result in recommendations on nutritional solutions / additives on the improvement of gut health in pigs. In parallel, the data that is being collected will be used in order to generate a database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of gut health and performance (comparable to the poultry microbiota chip).

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

As starting point of this project, results of various nutritional intervention studies in nursery pigs will be compared with each other, as well as with relevant published research and our own previous work. Based on these results, dietary solutions will be identified that are hypothesized to improve gut health of pigs when provided to the sow, to the piglet pre and/ or post weaning, or to the pig in the finisher phase, resulting in improved performance. Next to this, literature and internal data will be reviewed to determine what biomarkers are already described as relevant in relation to gut health and pig performance.

An experimental program will be developed based on the nutritional solutions that are identified to improve gut health. Different types of trials will be part of this experimental program, with the aim to improve gut health of pigs, focusing on post-weaning problems. First, nursery pig studies will be conducted as this is the main period of interest. Then, additional studies will be performed with sows / pigs before weaning to determine whether additional improvement in gut health can be achieved by already providing nutritional solutions and / or additives before weaning. In addition, studies will be performed investigating the carry-over effect of nutritional solutions and / or additives provided in the nursery phase to the finisher phase. Moreover, based on these outcomes and literature review nutritional solutions and / or additives will be selected that are hypothesized to positively affect gut health of pigs in *E. coli* challenged conditions. These strategies will be tested in *E. coli* challenge trials in nursery pigs. Finally, trials will be performed in which we combine promising nutritional solutions and / or additives into one solution or into a feeding program.

Each study is considered a milestone. Results of studies will be used to optimize the power required to detect differences in physiological parameters based upon the selected treatments. During the course of the project, biomarkers will be identified that show to be the most explanatory for health and performance, and in further trials focus will be on these selected parameters. For each study that is part of this project, the animal welfare body (AWB) will be consulted to discuss the proposed study design and how this relates to previous studies.

Nutritional solutions and / or additives are considered to be successful when we can show in our trials that they improve pig performance through improved gut health. Outcome parameters thus include performance, and the biomarkers we identify as being good indicators of gut health. These solutions might be combined in a package to be provided in the same period, or in different following periods (program). In parallel, the data that is being collected will be used in order to generate a database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of pig gut health and performance.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Nursery pig studies
2	Blood and tissue collection studies
3	*E. coli* challenge nursery pigs
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22000
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 — Type of animal procedure: Nursery pig studies

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and / or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that may function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

An experimental program will be developed based on the nutritional solutions and / or additives that are identified to improve gut health. Different types of trials will be part of this experimental program, with the focus on improving gut health of nursery pigs to prevent post-weaning problems. This objective requires the execution of feeding trials with pigs after weaning. Most *in vivo* feed-intervention studies performed today measure standard performance parameters; feed intake, growth and general health status (i.e. mortality and removal). This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Several studies indicate that dietary solutions directly or indirectly influence gut health, but many questions still remain unanswered in this area. It appears that the detailed mechanisms and modes of action of intestinal structural and functional alterations first need to be better understood in order to develop new dietary solutions.

In addition, the aim of this project is to generate a database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of gut health and performance. This can be done with any gut health related biomarkers (e.g. microbiota, cytokines, acute phase proteins). The use of such information can help us in the understanding of gut health by characterizing interactions between diet, structure and function of the GIT, microbiota, digestive function and immune status. In addition to that, we expect that ultimately

these biomarkers can be applied for prediction of performance and health issues, both in research setting and on farm. This requires the development of an experimental program that contains additional measurements besides performance.

General experimental design
Dietary treatments are usually provided from the moment the pigs enter the facility, which is at weaning. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as (fermentable) protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next, adequate feed intake before and after weaning is crucial for good gut health. Therefore, nutritional interventions stimulating feed intake will be tested in the scope of this project. Examples can be the use of flavors, different physical feed forms and compounds affecting mineral balance. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

Nursery trials normally end at 6 / 7 weeks post weaning but may end at a younger age. Body weight of the pigs is measured at weaning, at several time points during the trial and at the end of the trial period. In addition, feed intake is measured at these time points. Because the pigs are group housed, this is an average for the pen. This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, additional measurements are required. This includes blood collection, tissue collection, clean feces or urine collection by colostomy bags, or individual feed intake (which requires individual housing). In addition, pigs may be deprived from feed (max 24 h) because of specific blood parameters that are influenced by feeding status or as model to mimic post-weaning feed intake depression. Each of these measurements is further described in the following sections.

Outcome parameters in which the effects of nutritional solutions / additives will be assessed are:

- Growth performance
  - Body weight gain
  - Feed intake (pen average or individual)
  - Feed efficiency (pen average or individual)
- Stool quality
- Blood parameters for e.g.:
  - Immune competency
  - Clinical chemistry
  - Antioxidant activity
- Dissection for e.g.:
  - Immune competency
  - Microbiota status
  - Histology
- Urine / feces collection for e.g.:
  - Digestibility
  - Mineral balance

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

Depending on the nutritional solutions / additives studied, (a combination of) the following procedures will be applied:

Blood collection
Blood collections are mainly required in trials where we are interested in immune and clinical parameters, and antioxidant status of the pigs. To be able to measure differences in physiological parameters over time, it is necessary to take blood samples at multiple time points during the trial, preferably from the same pig each time point. The exact time points depend on the specific research questions of the trial. Blood will be collected at a maximum of eight time points per pig during the trial. There will be a minimum of 24 hours between two consecutive blood collections from the same pig.

Tissue collection

Gut morphology is a major contributor to gut health. In certain trials, we are interested in the effect of a nutritional solution on morphology, and therefore it is required to collect tissue samples after the pig has been killed.

Feed deprivation
In trials in which we want to mimic post-weaning feed intake depression, or in which we need to take blood samples to analyze specific blood parameters that are influenced by feeding status, it may be necessary to deprive the pigs from feed for a certain time period (a maximum of 24h). Water is always provided ad libitum.

Individual housing
Individual housing of pigs is not standard, but depends on the nutritional solutions and / or additives studied in the specific trial. During such a trial, pigs will be housed in pairs within the pens, and during the period of individual housing, this pen will be split in two. The housing system enables these pigs to still have visual, olfactory and acoustic contact. Pen size of individually housed pigs is 0.75m^2.

If possible, we will limit the period of individual housing to 24 hours. This is the case for studies in which we obtain information on digestibility or mineral balance. In these studies, colostomy bags will be used in order to collect the feces or urine quantitatively and uncontaminated. Individual housing is required to prevent the pigs from detaching each other's bags. Pigs will only be housed individually for the period needed to take the samples.

The main reason for individual housing, however, is to determine relations between individual feed intake and biomarkers. This is important within this project because it is well-known that feed intake of pigs can be highly variable, especially in the period just after weaning, and is directly affecting gut health. In this case, a period of 24 hours of individual housing will not be sufficient, but it will be limited to a maximum of 5 days. A period of 5 days enables us to determine a reliable average daily feed intake of the individual pigs. Feed intake is correlated to piglet gain, which we measure at pig level; however, especially in the first days post weaning this correlation is low. In addition, we have previous proof of a biomarker [redacted] that is correlated to feed intake, but not to gain of pigs. This finding showed us that by having individual animal data we could create a database with higher variability than would be the case for group-housed pigs, resulting in a more robust model for detection and prediction. Gain can be negative depending on feed intake and / or health, but feed intake will always be positive.

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

Over the course of this project, it is expected to find 30-40 possible nutritional strategies modulating gut health of weaned pigs, leading to a maximum of 160 treatments that need to be tested within the course of this project (including control treatments). In all of these trials, blood will be collected from the pigs; however, only in part of these trials, tissue samples will be collected or pigs are deprived from feed or individually housed.

For each trial, a power analysis will be performed based on the main blood parameter measured in the trial to determine the number of pigs required. It is estimated that, based on our power analysis on performance, and experience with analysis of blood parameters, a maximum of 12 replications per treatment will be required. Pen is experimental unit, however, for blood and tissue collections, one pig per pen will be randomly selected to represent the pen.

In addition to this, next to blood analyses, performance will also be an important outcome parameter. By the nutritional strategies we select, we expect to influence both intake and gain by improving gut health. We expect a change of approximately 5-10% gain, based on literature and experience. Therefore, we want to detect a difference of at least 5% between treatments. Using power calculations based on historical data, an LSD of 5% for gain requires 10 replications per treatment with six pigs per pen.

B. The animals

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

The animals used in the current project are from a commercial line. Weaning occurs between 21-30 days of age, and both gilts and barrows are used. Studies will last for a maximum of 7 weeks post weaning.

We expect to study 32 treatments each year with group housed pigs, leading to a maximum of 384 nursery pigs required each year for blood collections (1920 pigs for the total project). Depending on the required outcome parameters of the trial, dissection will be performed on part of these pigs to obtain tissue samples.

In addition, we expect to study six treatments per year for which we need to deprive pigs from feed (for 24h). These pigs are housed with six pigs per pen (pen is experimental unit), leading to a maximum of 432 (treatments with 12 pens and 6 pigs per pen) nursery pigs required each year (2160 pigs for the total project). Finally, we expect to study a maximum of 12 treatments per year for which we need to house pigs individually. These pigs are housed in pairs for most of the trial, thus taking pair of pigs as experimental unit, leading to a maximum of 288 pigs required each year (1440 pigs for the total project, 50% max. 24 hours and 50% max. 5 days). We expect that blood will be collected from all of these individually housed pigs. This means the total number of animals requested for the duration of the project is 5520 (=1920+2160+1440). We expect that 15% (828) of these pigs will be killed in order to take tissue samples.

No genetically modified animals will be used.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Yes, it is possible that pigs used in these studies were already involved in neonatal pig studies, in which blood was collected from the pigs (at a maximum of 6 time points before weaning). However, it is not expected that the cumulative discomfort will be increased from mild to moderate because of re-use with this type of procedures.

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the consequences of nutritional solutions and / or additives post-weaning on gut health of the pig, it is necessary to use weaned pigs.

Replacement is not possible. The reaction of an animal to nutritional interventions and / or additives is multifactorial and includes a variety of physiological changes. It is not possible to study these effects with alternative techniques.

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired difference in growth performance, as well as in gut health parameters. The power calculations are based on historical internal data and data that will be gathered during the course of this project in order to reduce the number of animals involved where possible.

Refinement will be applied during blood collection when only a small quantity of blood is needed. If this is the case, a drop of blood will be collected from the ear instead of from a jugular vein. In the case of individual housing, pigs will be housed individually as short as possible to obtain the trial objectives. In addition, pigs are able to have visual, olfactory and acoustic contact with other pigs at all time. In addition, one toy per pen is provided to all pigs as distraction material. This toy is changed regularly.

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

Measures taken to reduce risk of pain, suffering and distress are focused on the strict enforcement of the monitoring of the welfare of animals two times per day, by means of a visual check. The procedures as part of this project are not expected to lead to any humane endpoints, however, in case of any issues related to welfare and health of the animals, measures will be taken. These measures include, depending on the specific situation; taking animals out of trial, providing them with medication, or euthanization if there is no alternative.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that despite all the ongoing research in this area, nutritional solutions and / or additives are still lacking in consistently improving gut health in pigs. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial swine industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☐ No

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

The housing and care of the animals used in the current experiment are in accordance with the Directive 2010/63/ EU, except for the absence of bedding material for group-housed pigs. Group-housed pigs will not be provided with bedding material to prevent accumulation of faeces in the pen. Accumulation of faeces may cause an unhygienic and uncomfortable environment for the pigs. One toy per pen is provided to the pigs as distraction material, which is changed regularly.

In some instances, pigs will be housed individually for a maximum of 5 days. Due to our housing system, individually housed pigs will have a pen surface of 0.75m^2, which is below the requirements by the Directive 2010/63/EU. Pigs that are housed individually or in pairs will be provided with rubber mats to increase their comfort.

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Blood collection might result in pain, but it only takes a short period and the pain will be limited to this period. Other procedures do not result in pain.

☐ Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Absence of bedding material in pens of group-housed pigs

Explain why these effects may emerge.

Group-housed pigs will not be provided with bedding material. Pigs are housed under practical conditions at our facility to facilitate application of our solutions in the field. Potentially edible bedding material (e.g. straw, sawdust) is not preferred to be used in feeding trials. A rubber mat could be provided as bedding material, however, its use with heavier pigs will leave little space for the manure drainage. This will result in more dirty pens than normal, increasing disease pressure.

According to Dutch housing legislation, weaned pigs are not required to be provided with partly closed floor, provided that the floor is not made from concrete. All our facilities meet these requirements. We do not expect that the pigs will experience additional discomfort through our experiments. Individually housed pigs will be provided with rubber mats.

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

Pigs that are housed individually or in pairs will receive rubber mats. In pens that are not partly closed, floors are not made from concrete.

J. Humane endpoints

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

☒ No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The animal procedures applied in this study (including blood collection, tissue collection, feed deprivation, individual housing (max. 24h), and/or colostomy bags) will result in a mild classification of the expected cumulative discomfort. There is an exception for the pigs that are individually housed for a period longer than 24 hours. This will results in moderate discomfort for 720 pigs.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Part of the animals will be euthanized in order to collect tissue samples (15% of all pigs).

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

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

☒ Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22000
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 2 Type of animal procedure: Blood and tissue collection studies

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and / or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that may function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

An experimental program will be developed based on the nutritional solutions and / or additives that are identified to improve gut health. Different types of trials will be part of this experimental program, with the focus on improving gut health of nursery pigs to prevent post-weaning problems. However, it is becoming apparent that especially parturition and the immediate period after birth are important for microbial colonization of the gut and development of the GIT of the piglets. Due to this development, research is expanding to the period before weaning, instead of only the period after weaning. This is including effect of sow nutrition during gestation and lactation on the piglets, and the effect of creep feed on the piglets. In this type of studies, it is important to take blood samples from neonatal piglets and / or sows, to be able to measure the effect of the nutritional solutions on the development of the pig's gut.

In addition, what happens during the nursery period of the pig will most likely have effects in later life. Therefore, we want to follow-up finisher pigs to determine if the nutritional solution they received in the weaner phase is affecting later performance. Another possibility is to test nutritional solutions of which we expect to improve gut health during the finisher period. Performance parameters are measured during the trial period, which is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, trials require additional measurements. By taking blood samples, we

will be able to obtain information on e.g. immune competency and clinical chemistry. Tissue samples can provide us with more knowledge on gut morphology, which is a major contributor to gut health.

General experimental design
Dietary treatments will either be provided to the sow, to study transgenerational effect on gut health, or to the pigs before weaning or during the finisher phase to determine direct effects on gut health. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next, adequate feed intake before weaning is crucial for good gut health and to stimulate feed intake after weaning. Therefore, also nutritional interventions stimulating feed intake will be tested in the scope of this project. Examples can be the use of flavors and different physical feed forms and compounds. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health in either neonatal or finisher pigs will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

Body weight of the pigs is measured at the start of the trial period, at several time points during the trial and at the end of the trial period. In addition, feed intake is measured at these time points. Because the pigs are group housed, this is an average for the pen (in the case of neonatal and finisher pigs). This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, additional measurements are required. This includes blood and tissue collection. These measurements are further described in the following sections.

Outcome parameters in which the effects of the nutritional solutions and / or additives will be assessed, are:

- Growth performance:
    - Body weight gain
    - Feed intake
    - Feed efficiency
- Blood parameters for e.g.:
    - Immune competency
    - Clinical chemistry
    - Antioxidant activity
- Dissection for e.g.:
    - Immune competency
    - Microbiota status
    - Histology

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

Depending on the nutritional solutions / additives studied, (a combination of) the following procedures will be applied:

Blood collection
To be able to measure differences in physiological parameters over time, it is necessary to take blood samples at multiple time points during the trial, preferably from the same pig each time point. The exact time points depend on the specific research questions of the trial. Blood will be collected at a maximum of six time points per pig during the trial. There will be a minimum of 24 hours between two consecutive blood collections from the same pig.

Tissue collection
In certain trials, we are interested in the effect of a nutritional solution on morphology, and therefore it is required to collect tissue samples after the pig has been killed.

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

Over the course of this project, it is expected to find several interesting nutritional strategies

hypothesized to modulate gut health related to finisher pigs as well as to sows and piglets pre-weaning, leading to a maximum of eight treatments (including controls) to be tested in both finisher pigs and sows / neonatal pigs each year.

The number of sows / piglets per litter required for blood sampling depends on the blood parameter of interest, thus a power analysis will be performed before each trial. The same procedure will be applied for finisher pigs in order to determine total number of pigs needed.

B. The animals

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

The animals used in the current project are from a commercial line. Both (lactating) sows and neonatal pigs (gilts and boars / barrows) are included in this procedure. In addition, finisher pigs will be used in trials that last until the pigs have achieved an average body weight of 120 kg. After, they are sent to a common slaughterhouse.

It is estimated that a maximum of 480 sows, 1440 piglets pre-weaning and 480 finisher pigs will be necessary for the project. The total number of animals requested for the duration of the project is 2400. We expect that 10% of these pigs will be killed for tissue collection.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Yes, it is possible that carry-over effects of the nutritional solutions provided in the nursery study will be measured in a consecutive finisher pig trial. In addition, it is possible that a finisher pig trial in which blood needs to be collected, will follow up on a nursery trial in which blood was collected from the piglets. However, this is not expected to occur in more than one trial per year due to the limited number of finisher pig trials in which blood will be collected. In addition, blood can be sampled from sows that have been sampled in previous trials. Cumulative discomfort will not be increased from mild to moderate because of re-use with this type of procedures (blood will be collected for a maximum of 14 times in total; 8 times in nursery and 6 times in neonatal or finisher pigs).

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the consequences of nutritional solutions and additives on gut health of the pig, it is necessary to use pigs.

Replacement is not possible, as alternative techniques are limited. The reaction of an animal to nutritional interventions is multifactorial and includes a variety of individual specific reactions including hormonal, behavioral and physiological changes. It is not possible to study these effects with alternative techniques.

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired difference in physiological parameters, as well as growth. The power calculations are based on historical internal data and data that is gathered during the course of this project.

Refinement will be applied during blood collection when only a small quantity of blood is needed. If this is the case, a drop of blood will be collected from the ear instead of from a jugular vein. In addition, one

toy per pen is provided to all pigs as distraction material. This toy is changed regularly.

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

Measures taken to reduce risk of pain, suffering and distress are focused on the strict enforcement of the monitoring of the welfare of animals two times per day, by means of a visual check. The procedures as part of this project are not expected to lead to any humane endpoints, however, in case of any issues related to welfare and health of the animals, measures will be taken. These measures include, depending on the specific situation; taking animals out of trial, providing them with medication, or euthanization if there is no alternative.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that despite all the ongoing research in this area, nutritional solutions and / or additives are still lacking in consistently improving gut health in pigs. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial swine industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☐ No

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

The housing and care of the animals used in the current experiment are in accordance with the Directive 2010/63/ EU, except for the absence of bedding material. Pigs will not be provided with bedding material (rubber mats) to prevent accumulation of faeces. Accumulation of faeces may cause an unhygienic and uncomfortable environment for the pigs. One toy per pen/ farrowing crate is provided to the pigs/ sows as distraction material, which is changed regularly.

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Blood collection might result in pain, but it only takes a short period and the pain will be limited to this period.

☐ Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Absence of bedding material

Explain why these effects may emerge.

Pigs will not be provided with bedding material. Pigs are housed under practical conditions at our facility to facilitate application of our solutions in the field. Potentially edible bedding material (e.g. straw, sawdust) is not preferred to be used in feeding trials. A rubber mat could be provided as bedding material, however, its use with heavier pigs will leave little space for the manure drainage (since already <40% of the pen is concrete floor). This will result in more dirty pens than normal, increasing disease pressure.

According Dutch housing legislation, lactating sows are not required to be provided with partly closed floor, provided that the floor is not made from concrete. Finisher pigs and gestating sows are required to be provided with partly closed floor (<40%). All our facilities meet these requirements. We do not expect that the pigs will receive additional discomfort through our experiments.

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

Pens of the finisher pigs and gestating sows contain partly concrete floors (<40%). Floors in pens of lactating sows are not concrete.

J. Humane endpoints

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

☒ No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The animal procedures that will be applied in this study include blood and tissue collection. This results in a mild classification of the expected cumulative discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Part of the pigs (10%) will be euthanized in order to collect tissue samples.

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

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

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22000
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 3 Type of animal procedure: *E. coli* challenge nursery pigs

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and / or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that may function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

Based on literature and nursery studies executed in this project, we aim to identify nutritional solutions and / or additives that will reduce infection or modulate gastrointestinal microbial response in pigs. Some of these compounds might be more beneficial to the gastro-intestinal environment of pigs during a stressful event, such as a pathogen challenge. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection is one of the most important causes of post-weaning diarrhea in pigs. Therefore, *E. coli* challenge in nursery pigs will be selectively used in this project.

General experimental design
Dietary treatments are usually provided from the moment the pigs enter the facility, which is at weaning. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as (fermentable) protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next to that, new ingredients and additives that are hypothesized to reduce infection or modulate gastrointestinal microbiota in pigs under pathogen challenge will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

E. coli challenge trials normally end at 3 or 4 weeks post weaning but may also end at a younger age. Pigs will be provided the *E. coli* challenge between 0 and 8 days post weaning. Body weight of the pigs is

measured at weaning, at several time points during the trial and at the end of the trial period. Feed intake is measured at these time points. Because the pigs are housed in pairs, this is an average for the pen. This performance data is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, additional measurements are required. This includes blood and tissue collection. Each of these measurements is further described in the following sections.
Outcome parameters in which the effects of the nutritional solutions and / or additives will be assessed, are:

- Growth performance
  - Body weight gain
  - Feed intake (pair average)
  - Feed efficiency (pair average)
- Stool quality
- Mortality / morbidity
- Blood parameters for e.g.:
  - Immune competency
  - Clinical chemistry
  - Antioxidant activity
- Dissection for e.g.:
  - Immune competency
  - Microbiota status
  - *E. coli* counts

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

At weaning, pigs are allocated to their treatments. Pigs will be raised for 3 to 4 weeks, housed with two pigs per pen, comparing two oral challenges (placebo or infected). Between 0 and 8 days post weaning, all pigs part of the *E. coli* challenge will be orally inoculated with *E.coli*. Control pigs will receive a 'scam' oral inoculation, to simulate the level of stress caused by the inoculation itself, without providing the pigs with the actual *E. coli*. During the trial, piglets are weighed, and faeces is scored at several time points. In addition, rectal temperature of the pigs is monitored twice per day during the first week after inoculation. At several time points during the trial, blood samples are collected. At the end of the trial, all pigs are euthanized in order to collect tissue samples.

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

Over the course of this project, it is expected to find several interesting nutritional strategies that we want to test in the nursery period under a controlled *E. coli* challenge. In all of these trials, part of the pigs will be challenged with *E. coli*, and blood and tissue samples need to be collected.

A power analysis will be performed before each trial to determine the required number of pigs.

B. The animals

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

The animals used in the current project are from a commercial line. Weaning occurs at a range of 21-30 days of age and both gilts and barrows are used in all studies. A study will last for a maximum of 4 weeks.

It is estimated that, based on our own experience with this method, and literature, a maximum of 12 replications per treatment will be required. Pigs will be housed in pairs. We expect to study six treatments each year, leading to a maximum of 144 nursery pigs required each year for *E. coli* challenge. The total number of animals requested for the duration of the project is 720.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Yes, it is possible that pigs used in these studies were already involved in neonatal pig studies (blood collections). However, it is not expected that the cumulative discomfort will be increased from moderate to severe because of re-use with this type of procedures.

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the consequences of nutritional treatments on performance and physiological parameters of the pig in *E. coli* challenge conditions, it is necessary to make use of the target animal.

Replacement is not possible, as alternative techniques are limited. Weaning has a major impact on the physiology of the pig, which is not possible to simulate with e.g. *in vitro* models.

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired difference in growth performance, as well as in physiological parameters. The power calculations are based on historical internal data and data that is gathered during the course of this project. Pigs will not be housed with six pigs per pen, as we usually do in our nursery trials, but in pairs. This will reduce the number of pigs required for the *E. coli* challenge.

Refinement will be applied during blood collection when only a small quantity of blood is needed. If this is the case, a drop of blood will be collected from the ear instead of from a jugular vein. In addition, pigs will not be housed individually but in pairs. This will enable them to express better their social behaviour and consequently reduce post-weaning stress.

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

Measures taken to reduce risk of pain, suffering and distress are focused on the strict enforcement of the monitoring of the welfare of animals two times per day, by means of a visual check. Furthermore, possibilities for humane endpoints have been defined.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that despite all the ongoing research in this area, nutritional solutions and / or additives are still lacking in consistently improving gut health in pigs. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial swine industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Blood collection might result in pain, but it only takes a short period and the pain will be limited to this period. In addition, pigs will likely experience *E. coli* symptoms, including fever, which may result in pain. *However, these symptoms are part of the E. coli challenge model. The use of pain relieving methods might therefore influence trial results.*

☐ Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Symptoms of *E. coli* infection

Explain why these effects may emerge.

Pigs will be inoculated with *E. coli* and therefore it is very likely that they will experience *E. coli* symptoms, including fever and diarrhoea.

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

Pigs will be monitored closely to determine severity of *E. coli* symptoms. Humane endpoints are identified as described in the following section.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Pigs are checked twice a day so we can detect discomfort, and act accordingly in time. Humane endpoints will be applied when one of the following conditions is occurring:

- Dehydration (combination of the following signs: watery diarrhoea, lethargy, rough hair, sunken belly and eyes)

- Temperature > 40.5 °C for three consecutive observation moments
- Reduction in body weight more than 10% over a 3 day period
- Bloody diarrhoea

Indicate the likely incidence.

Based on previous experience it is estimated that not more than 10% of the pigs will reach a humane endpoint

K. Classification of severity of procedures

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

The E. coli challenge model will result in a:

Moderate level of discomfort in 80% of the pigs: Based on previous experience and literature, proposed infection model will be able to mimic conditions of an *E.coli* infection where growth performance will be affected, but with mortality at a maximum of 10% per round. Discomfort will be caused by most likely diarrhoea, low feed intake and gain, and possibly limited mortality. In addition, blood and tissue samples will be collected from these pigs.

Mild level of discomfort in the other 20% of the pigs: These pigs receive the placebo challenge (scam inoculation). In order to take the blood samples, the pig is fixated for the time required to take the blood sample. These pigs will also be euthanized for sample collection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The animals will be euthanized in order to collect tissue samples.

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

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

☒ Yes

7.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV
[redacted]

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
AVD2200020171646

Bijlagen
2

Datum 3 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 mei 2017. Het gaat om uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD2200020171646. 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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:
3 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD2200020171646

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
3 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD2200020171646

Gegevens aanvrager

Uw gegevens	
Deelnemersnummer NVWA:	22000
Naam instelling of organisatie:	Provimi BV
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	24131527
Straat en huisnummer:	[redacted]
Postcode en plaats:	[redacted]
IBAN:	NL39RABO0300028598
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Provimi BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker	
Naam:	[redacted]
Functie:	Research Scientist
Afdeling:	SMT R&D
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Datum:
3 mei 2017
Aanvraagnummer:
NVD2200020171646

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? [x] 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 juli 2017
Geplande einddatum:	30 juni 2022
Titel project:	Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs
Titel niet-technische samenvatting:	Screening van voedingsstrategieën door middel van het gebruik van fysiologische parameters gericht op het verbeteren van darmgezondheid in varkens
Naam DEC:	DEC Wageningen UR
Postadres DEC:	Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (HP 231)
E-mailadres DEC:	dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.541,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:
[x] Projectvoorstel
[x] Beschrijving Dierproeven
[x] Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	[redacted]
Datum:	3 mei 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV
[redacted]

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
AVD2200020171646

Bijlagen
2

Datum 3 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 3 mei 2017
Vervaldatum: 2 juni 2017
Factuurnummer: 171646

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD2200020171646	€ 1.541,00

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.

DEC WUR 13 juni 2017

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD2200020171646**

2. Titel van het project: Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs

3. Titel van de NTS: Screening van voedingsstrategieën door middel van het gebruik van fysiologische parameters gericht op het verbeteren van darmgezondheid in varkens

4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:
   DEC-WUR
   [redacted]
   Secretaris: dec@wur.nl

6. Adviestraject
   Ontvangen door DEC: 03-05-2017
   Aanvraag compleet: ja
   In vergadering besproken: 15-05-2017
   Anderszins behandeld:
   Termijnonderbreking(en) van 16-05-2017 tot 29-05-2017 en van 06-06-2017 tot 09-06-2017 en van 12-06 tot 13-06-2017
   Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
   Aanpassing aanvraag: 29-05-2017, 09-06-2017 en 13-06-2017
   Advies aan CCD: 13-06-2017

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: 16-05-2017
   Datum antwoord: 29-05-2017, 09-06-2017 en 13-06-2017
   Gestelde vragen *en antwoorden*:
   M.b.t. het projectvoorstel:
   De DEC verzoekt u een uitgebreidere toelichting te geven op het proces dat leidt tot de keuze van de toe te dienen stoffen en een indicatie te geven van de selectiecri-teria (op hoofdlijnen) die hierbij zullen worden gehanteerd.
   Er is nadere toelichting toegevoegd in het projectvoorstel onder 3.4.2. D.m.v. een literatuurstudie en studie van voorgaande interne proeven zal een lijst worden samengesteld van mogelijke kandidaten om getest te worden binnen dit project. Van deze producten en/of concepten wordt een selectie gemaakt, met als belangrijkste criterium een verbetering in groei d.m.v. verbeterde darmgezondheid. Daarnaast zullen we ook producten en/of concepten selecteren waar nog geen (relevante) in vivo data beschikbaar van is, maar waarvan interessante resultaten in vitro zijn gevonden. Ook zullen producten en/of concepten geselecteerd worden waarvan nog geen in vivo of in vitro data beschikbaar is, maar waarvan de hypothese veelbelo-vend is m.b.t. het positieve effect op darmgezondheid.
   M.b.t. de appendices:
   U verwijst in de laatste alinea van D. naar "guidelines as described in the study protocol with respect to monitoring the welfare of animals throughout the study". Het is de DEC niet duidelijk welke guidelines en welk study protocol hiermee worden bedoeld en zij verzoekt u dit te verhelderen.
   Deze paragraaf is anders verwoord in de drie appendices om meer duidelijkheid te creëren.

De DEC verzoekt u in appendix 1 en 2 bij F. (accommodation and care) toe te voegen welke kooiverrijking wordt toegepast en dit ook te vermelden bij D. (verfijning). Tevens verzoekt ze u bij appendix 2 uitgebreider te beargumenteren waarom er geen rubberen matten worden gebruikt, aangezien rubberen matten in de ogen van de DEC even goed schoon te houden zijn als een andere ondergrond.
Per hok wordt een speeltje verstrekt, dat regelmatig wordt verwisseld. Dit is toegevoegd in beide appendices bij F. en D.
Een uitgebreidere argumentatie is toegevoegd bij appendix 2, onderdeel I. De dieren worden onder praktijkomstandigheden gehuisvest, om toepassing in de praktijk te faciliteren. Het verstrekken van mogelijk eetbaar ondergrond materiaal is niet wenselijk in voerproeven. Rubberen matten zouden als ondergrond materiaal verstrekt kunnen worden, echter, bij de zwaardere biggen en vleesvarkens zal het gebruik van een rubberen mat weinig ruimte overlaten waar de mest nog door het rooster kan, hierdoor wordt het hok snel vies wat de infectiedruk verhoogt. We verwachten dat bij gebruik van een kleinere mat, de varkens eerder gaan vechten om een plek op de mat. Dit kan de stress van de dieren verhogen en daarmee het welzijn verminderen.
De DEC heeft naar aanleiding van uw beantwoording van haar vragen nog een aanvullende vraag. U geeft aan, dat de varkens onder praktijkomstandigheden worden gehouden. Onder praktijkomstandigheden mogen dieren echter alleen op roosters gehuisvest worden mits minimaal 40 % bestaat uit een dichte vloer (http://www.rvo.nl/onderwerpen/agrarisch-ondernemen/dieren/dierenwelzijn/welzijnseisen-voor-dieren/varkens), http://www.ikbnederland.nl/wp-content/uploads/Bijlage-3j-Overzicht-welzijnseisen-voor-varkens.pdf , zie punt 11 en punt 17 in dit artikel). U geeft ook aan dat de varkens allemaal op een dichte vloer/mat willen liggen. Het is aan u als onderzoeker om de ruimte zo in te richten, binnen de wettelijke regels, dat het welzijn niet geschaad wordt en de proeven niet meer ongerief geven dan de varkens zouden ondervinden onder praktijkomstandigheden. Als door de experimenten varkens zich onwel kunnen voelen, zullen ze meer gaan liggen en hebben ze extra behoefte aan een warme, droge ligplaats. Als u problemen voorziet met natte hokken of vechten om een dichte ligplaats op een mat, zou het wellicht meer voor de hand liggen om de dichte ligruimte te vergroten zodat alle dieren een dicht stuk vloer hebben om te liggen. Als dieren gaan vechten om allemaal op de mat te gaan liggen, hebben ze kennelijk behoefte aan een warme, zachte ondergrond. De DEC verzoekt u een oplossing hiervoor te zoeken d.m.v. vergroting van het vloeroppervlak.
We hebben over onderstaande contact gehad met onze adviseur op het gebied van stalinrichting [redacted] *en hij gaf aan dat de beschikbare vloer van een stal wel geheel uit roostervloer bestaan als de vloer bestemd is voor gespeende biggen of zogende zeugen met biggen. Echter mag de roostervloer dan niet vervaardigd zijn van beton. Onze roostervloeren van de gespeende biggen en zogende zeugen met biggen zijn van kunststof, dus in dat geval voldoen wij aan deze eisen voor praktijkomstandigheden. Zie ook deze link (Artikel 2.18. Vloeren) http://wetten.overheid.nl/BWBR0035217/2017-01-01#Hoofdstuk2 : De voor de varkens beschikbare vloer van een stal bestaat niet geheel uit roostervloer, tenzij de vloer is bestemd voor gespeende varkens of zogende zeugen met biggen en niet is vervaardigd van beton.*
Vloeren van onze vleesvarkens en dragende zeugen bestaan wel voor minimaal 40% uit dichte vloer, dus hier voldoen wij ook aan de eisen van praktijkomstandigheden. Daarnaast verwachten wij dat door onze experimenten de varkens geen extra ongerief zullen ondervinden en dat we daarom geen extra ligcomfort hoeven te verstrekken. Uitzondering hierop zijn de proeven waarin de biggen een E. coli challenge ondervinden en de proeven waarin de biggen individueel gehuisvest worden. In deze gevallen verstrekken wij een rubberen mat voor extra ligcomfort. Dit is beschreven in Appendix 1.
Bovendien verzoekt ze u in appendix 2 en 3 bij I het tweede deel in te vullen (maatregelen ter beperking van ongerief).
Dit is toegevoegd in appendix 2. De hokken bevatten gedeeltelijk dichte vloer.
In appendix 3 wordt al wel wat genoemd, namelijk: 'Pigs will be monitored closely to

determine severity of E. coli symptoms. Humane endpoints are identified as described in the following section'. Is dit voldoende of wordt hier een uitgebreider antwoord verwacht?
De DEC is van mening dat de humane eindpunten (HEPs) in appendix 3 nogal extreem geformuleerd zijn en verzoekt u deze anders te definiëren, m.n. waar het gaat om koorts. Zij verzoekt u dit te wijzigen in 40.5^0, aangezien koorts $>41^0$ op drie opeenvolgende meetmomenten kan betekenen dat er al enkele dagen sprake is van $>40^0$. Bovendien verzoekt zij u duidelijker aan te geven of de HEPs worden toegepast bij het optreden van alle vier (en/en) of bij een van de beschreven omstandigheden (of).
Het humane eindpunt m.b.t. koorts is aangepast van $>41^0$ naar $>40.5^0$. HEPs worden toegepast bij optreden van één van de beschreven omstandigheden. Dit is ook duidelijk gemaakt in J.
M.b.t de NTS:
De DEC verzoekt u bij 3.4. toe te voegen, dat de negatieve gevolgen van het besmettingsmodel worden beperkt door het toepassen van HEPs.
Dit is toegevoegd.
Daarnaast verzoekt ze u bij 3.5. de procentuele verhouding tussen de dieren die licht en matig ongerief ondervinden in overeenstemming te brengen met de appendices.
Dit is niet aangepast want het klopt zoals het nu in de NTS staat. We hebben hier gekeken naar de totale project aanvraag (de combinatie van de drie appendices), dus hier kan wat verwarring zijn ontstaan. Hierbij de berekening om te laten zien hoe deze percentages tot stand zijn gekomen. Ik hoor het graag mochten hier nog onduidelijkheden over zijn.
*In appendix 1 'Nursery pig studies' (B), wordt beschreven dat de aanvraag geldt voor een totaal van 5520 dieren. Daarnaast wordt bij K beschreven dat verwacht wordt dat hiervan 720 dieren matig ongerief zullen ondervinden. In appendix 2 'Blood and tissue collections' wordt genoemd bij K dat alle dieren licht ongerief zullen ondervinden. Ten slotte wordt in appendix 3 'E. coli challenge nursery pigs' genoemd dat naar verwachting 720 dieren ongerief zullen ondervinden, waarvan 80% matig ongerief (=576 dieren). Deze totale aanvraag bedraagt 8640 dieren (combinatie van de drie appendices). Hiervan wordt verwacht dat 720 + 576 (= 1296) dieren matig ongerief ondervinden. Voor de gehele aanvraag wordt dus verwacht dat 15% van de dieren matig ongerief zal ondervinden (=1296/8640*100), en 85% licht ongerief.*
Bovendien verzoekt ze u de formulering bij 4.2. te wijzigen in "Het aantal benodigde dieren wordt per studie statistisch bepaald" (aangezien anders de suggestie wordt gewekt dat er ook meer dieren kunnen worden gebruikt).
Dit is aangepast.
In de laatste alinea geeft u aan dat er maatregelen worden genomen wanneer welzijn aangetast lijkt. De DEC verzoekt u dit nader te specifiëren, aangezien er wordt gevraagd om de maatregelen te vermelden.
Dit is toegevoegd. Voor de dieren in het besmettingsmodel zijn humane eindpunten vastgesteld. Voor de rest van de dieren worden geen problemen verwacht ten aanzien van het welzijn waarbij ingegrepen zou moeten worden. Mochten er wel problemen ontstaan, kunnen (afhankelijk van de problemen) dieren uit proef worden gehaald, medicatie ontvangen, of geëuthanaseerd worden.
Tot slot verzoekt de DEC u de NTS zo nodig aan te passen conform de aanpassingen in het projectvoorstel en de appendices.
Dit is aangepast. Bij Verfijning is toegevoegd dat elk hok verrijkt is met een speeltje als afleidingsmateriaal.

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. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het project beoogt biomarkers te identificeren die iets zeggen over diergezondheid en onderzoeken hierbij dieren zowel voor als (kort) na het spenen alsook op latere leeftijd en zeugen. Het project bestaat uit het testen van verschillende voeders/ additieven op hun effect op darmgezondheid van dieren voor en (kort) na spenen alsook het onderzoeken van een mogelijk heilzame werking bij een gechallenged dier (E-coli-model). De aanpak is navolgbaar en helder beschreven, het vormt een samenhangend geheel.
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 is het identificeren van voeders of voederadditieven die de darmgezondheid van biggen van jong tot oud kunnen verbeteren en daarnaast het identificeren van biomarkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie.
   Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het bijdragen aan een voederpalet voor biggen dat bijdraagt aan een verhoogde dier- en volksgezondheid, een verhoogd dierenwelzijn en aan het verminderen van antibioticumgebruik.
   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
   Doeldieren: welzijn en gezondheid
   De onderzoeker/ het instituut: economisch belang en kennisvermeerdering
   De sector/ industrie: economisch belang
   Maatschappij: Gezondheidsbelang – Minder antibioticagebruik; sociaal acceptabele productie (door verbeterd dierenwelzijn).
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

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. De onderzoeksgroep die de proeven in dit project uitvoert heeft de nodige expertise om het beste resultaat te waarborgen. De verantwoordelijke aanvrager van het huidige project is een wetenschappelijk ervaren medewerker. Naast de aanvrager bestaat het projectteam uit experts met MSc- of PhD-diploma's in relevante disciplines en ervaring in dit specifieke onderzoeksgebied.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC acht de keuze voor het testen van voedingsmiddelen/ additieven zowel voor als na het spenen alsook op latere leeftijd als het gaat om het identificeren van biomarkers en darmgezondheid legitiem. Het is niet duidelijk welke stoffen er zullen worden getest. Dit is uiteindelijk ter beoordeling van de IvD, waar het gaat om de specificatie. Dit project past binnen de categorie CRO, waarvoor de CCD een aparte voorziening heeft gecreëerd, waarbij de toetsing van de concrete additieven aan de IvD wordt overgelaten en eventueel wel vooraf of achteraf rapportage aan de CCD wordt gevraagd. De onderzoeker heeft een indicatie gegeven van het proces dat leidt tot de keuze van die stoffen en de selectiecriteria op hoofdlijnen die zullen worden gehanteerd. Voor de DEC is dat afdoende.

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 pijnbestrijding toegepast. Daarnaast kan er sprake zijn van hergebruik van dieren. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. De dieren worden niet altijd gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. In dierproef type 1 worden in sommige gevallen varkens individueel gehuisvest voor maximaal 5 dagen. Deze varkens hebben een hok van 0.75 m^2 (minder dan vereist volgens de richtlijn); in dierproef type 1 en 2 ontbreekt bedding. De keuze hiervoor is voldoende onderbouwd.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als licht/matig voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. D.m.v. humane eindpunten (HEPs) wordt voorkomen dat het ongerief boven "matig" uit komt. Bij een deel van de dieren (besmettingsmodel) kan diarree en verminderde voeropname optreden. Daarnaast kan de individuele huisvesting van een ander deel van de dieren (maximaal 5 dagen) verhoogde stress opleveren. Het nemen van bloedmonsters (bij alle dieren) kan een lichte vorm van stress veroorzaken bij de varkens.
12. Naast ongerief is er geen aantasting van de integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefbehandelingen (de heelheid en gaafheid van de dieren worden niet aangetast en de afhankelijkheid van de mens niet vergroot).
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.

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. De reactie van een varken op voeding is multifactorieel en bestaat uit een groot aantal fysiologische processen. Deze processen zijn tot op heden nog te complex om nagebootst te worden met alternatieve technieken. Onderzoek vindt plaats aan het doeldier.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Het minimale aantal benodigde dieren wordt per studie statistisch bepaald. Dit aantal zal, waar mogelijk, worden verminderd op basis van eerder behaalde proefresultaten.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Desondanks zijn er ook HEP's ingesteld in deelexperiment 3. Bloedafname vindt zo mogelijk uit het oor plaats. In geval van individuele huisvesting kunnen de dieren elkaar wel zien, horen en ruiken. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
18. Een deel van de dieren wordt gedood in het kader van het project. Dit is noodzakelijk voor het behalen van de doelstellingen van het project: Een aantal effecten wordt beoordeeld in weefseltissues van de dieren. 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 ontwikkelen van nieuwe producten voor het verbeteren van darmgezondheid bij varkens op tegen het gebruik van 8640 proefdieren, die licht (85 %) of matig (15 %) ongerief ondervinden?
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. Zij heeft meegewogen dat er gezien het directe doel voor de onderzoekers/ het onderzoeksinstituut sprake is van een beperkt voordeel. Het gaat

hierbij om een economisch voordeel en kennisvermeerdering. Ook al leidt het project niet tot de doelen m.b.t. verbetering van darmgezondheid bij varkens, dan nog genereert het kennis (bijdragen aan een databank). Als het project zijn uiteindelijke doel haalt is er voor de doeldieren uiteindelijk sprake van een reëel en belangrijk voordeel. Het gaat hierbij om de waarden van gezondheid en welzijn.
Voor de varkenshouders is er dan sprake van een (beperkt) economisch voordeel door vermindering van de ziektelast. Daarnaast kan het bijdragen aan een verbeterde maatschappelijke acceptatie, waar enerzijds de boeren/ de sector belang bij hebben, anderzijds heeft de maatschappij belang bij een productiewijze die aansluit bij (breed) gedragen waarden. Daarnaast is er voor de maatschappij er sprake van een gering (gezondheids)belang door verminderd antibioticagebruik.
Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Een deel van de dieren zal maximaal matig nadeel ondervinden als gevolg van de handelingen binnen dit project. Gezien de bovengenoemde waarden bevorderd kunnen worden als gevolg van de resultaten van dit project acht de DEC het ethisch verantwoord dit onderzoek uit te voeren met maximaal 8640 dieren die licht tot matig ongerief ondergaan. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
   De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

9.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV
[redacted]

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
AVD2200020171646

Datum 20 juni 2017
Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 3 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" met aanvraagnummer AVD2200020171646. 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
U beschrijft dat de dieren ziekteverschijnselen zoals koorts en diarree kunnen ondervinden vanwege de E.coli besmetting. U past hiervoor geen pijnbestrijding toe. In dit geval moet u daarom bij punt H. in bijlage 3.4.4.3 onderbouwen waarom dat niet mogelijk is.
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. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:
20 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD2200020171646

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.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Velddriel, 27 juni 2017

Geachte heer/ mevrouw,

Bedankt voor het overbrengen van de feedback afkomstig van de CCD.

Bijgesloten de geüpdatet documentatie en ook hieronder nog een aparte toelichting (in italic) op de vragen en opmerkingen van de CCD. De aanpassingen in de aanvragen zelf zijn in italic weergegeven.

M.b.t. bijlage 3.4.4.3.:

- De CCD verzoekt bij punt H. in bijlage 3.4.4.3 te onderbouwen waarom het niet mogelijk is pijnbestrijding toe te passen voor dieren die ziekteverschijnselen ondervinden zoals koorts en diarree vanwege de E. coli besmetting.
  Deze symptomen maken onderdeel uit van het besmettingsmodel. Door middel van pijnbestrijding kunnen proefresultaten dus beïnvloed worden.

Ik hoop u hiermee van voldoende informatie te hebben voorzien. Ik hoor het graag mochten er nog aanvullende vragen zijn.

Met vriendelijke groet,

[redacted]

12.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV
[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220020171646

Uw referentie

Bijlagen
1

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 3 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" met aanvraagnummer AVD2200020171646. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 27 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een onderbouwing voor het niet toepassen van pijnbestrijding. U heeft bijlage 3.4.4.3 aangepast.

Op 25 juli 2017 hebben wij telefonisch contact gehad over de speenleeftijd van de biggen. In uw aanvraag beschrijft u dat de speenleeftijd van de biggen tussen de 21 en 30 dagen ligt. In de praktijk blijkt dit gemiddeld dag 22 te zijn. In uw aanvraag beschrijft u dat het moment van infectie op dag 0-8 na spenen ligt. U voert gemotiveerd aan dat het te kort na het spenen infecteren van de biggen substantieel nadelig invloed heeft op het eind resultaten van dit onderzoek.

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.
De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.
De specifieke voorwaarde over de speenleeftijd van de biggen en het moment van infectie wordt gesteld, omdat de CCD een ethisch dilemma signaleert met betrekking tot de intensieve veehouderij en de vroege speenleeftijd van biggen en de nadelige effecten op dierenwelzijn.

U kunt met uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" starten.
De vergunning wordt afgegeven van 25 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.
Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 13 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 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) voorwaarden 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.Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in de 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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

Algemeen Secretaris

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

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Provimi BV
Adres: [redacted]
Postcode en woonplaats:
Deelnemersnummer: 22000

of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" met aanvraagnummer AVD2200020171646, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Research Scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 3 mei 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 juni 2017, ontvangen op 13 juni 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 27 juni 2017, 25 juli 2017

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Nursery pig studies	Varkens (Sus scrofa domesticus)	5520	13% Matig 87% Licht
3.4.4.2 Blood and tissue collection studies	Varkens (Sus scrofa domesticus)	2400	Licht
3.4.4.3 E. coli challenge nursery pigs	Varkens (Sus scrofa domesticus)	720	80% Matig 20% Licht

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.

De biggen krijgen na het spenen voldoende tijd om te acclimatiseren en de dierproeven worden niet eerder gestart dan dat de dieren minimaal 28 dagen oud zijn. Dit sluit aan bij de beoogde wenselijke praktijk.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welke soort teststof, welke type dierproef en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 maart 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.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.
Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.
In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.