

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20209705	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, (natte handtekening) d.d. 15-04-2020				x		x		x	
2	Aanvraag projectvergunning, d.d. 15-04-2020				x		x		x	
3	Projectvoorstel bij aanvraag			x						
4	Bijlage dierproeven bij aanvraag			x					x	
5	NTS bij de aanvraag			x						
6	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 17-04-2020			x					x	
7	DEC-advies, d.d. 12-06-2020				x		x			
8	Projectvoorstel na DEC advies			x						
9	Bijlage dierproeven na DEC advies			x						
10	NTS na DEC advies			x						
11	Adviesnota aan CCD, d.d. 03-07-2020_met opmerkingen				x		x		x	x
12	Adviesnota aan CCD, d.d. 13-07-2020				x		x			
13	Beschikking concept, d.d. 13-07-2020				x		x		x	
14	Beschikking definitief, d.d. 13-07-2020				x		x		x	
15	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over aanvraag projectvergunning, d.d. 03-11-2020				x		x			

970521 OKT 2020

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	[X] Ja > Vul uw deelnemernummer in [] Nee > U kunt geen aanvraag doen	10400
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	Wageningen University 5.1 lid2e 09215846
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	Akkermaalsbos 12 59 6700AW Wageningen 5.1 lid2h Wageningen University & Research
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e Universitair docent 5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2e [] Dhr. [x] Mw.
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e Universitair Docent 5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2e [] Dhr. [x] Mw.
1.6	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon	(Titel) naam en voorletters	[] Dhr. [] Mw.

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

- 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

Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.3 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

- 2.4 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 Startdatum einddatum van het project? 1-9-2020
1-9-2025
- 3.2 Wat is de titel van het project? Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? Het evalueren van dieeteffecten op 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	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
		E-mailadres	dec@wur.nl

21 OKT 2020

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €	1.662,-
-----	-----------------------	---	---------

4.2	gaat het?	<input type="checkbox"/> Wijziging €	
	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
	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.	<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel + 2 bijlagen <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing <input type="checkbox"/> Melding Machtiging <input checked="" type="checkbox"/> Inkooporder: WUR1362104

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:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> • 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.
-----	--	---

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- 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

5.1 lid2e

Functie

gemandateerd v

Plaats

Wageningen

Datum

15-4-2020

Handtekening

5.1 lid2e



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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	10400
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	Wageningen University 5.1 lid2e 09215846
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	Akkermaalsbos 12 59 6700AW Wageningen 5.1 lid2h Wageningen University & Research
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e Universitair docent 5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2e [] Dhr. [x] Mw.
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e Universitair Docent 5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2e [] Dhr. [x] Mw.
1.6	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon	(Titel) naam en voorletters	[] Dhr. [] Mw.

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

- 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

- Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.3 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

- 2.4 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 Startdatum
einddatum van het project?
1-9-2020
1-9-2025
- 3.2 Wat is de titel van het project?
Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
Het evalueren van dieeteffecten op 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 Postadres E-mailadres	DEC Wageningen UR Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen dec@wur.nl
-----	--	--------------------------------------	--

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €	1.662,-
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.	<input type="checkbox"/> Wijziging € <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso <input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel + 2 bijlagen <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing <input type="checkbox"/> Melding Machtiging <input checked="" type="checkbox"/> Inkooporder: WUR1362104

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:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> • 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.
-----	--	---

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- 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

5.1 lid2e

Functie

gemandateerd

Plaats

Wageningen

Datum

15-4-2020

Handtekening

5.1 lid2e



Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University
1.3	Provide the title of the project.	Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs

2 Categories

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

Pig feeds traditionally contain large amounts of cereal grains complemented with soy (-by products). The latter originate to a large extent from South American countries, and both are competing directly with resources for human consumption, which could compromise the sustainability of these feeds. Hence, in the Netherlands, there is a change towards circular agriculture, as indicated in the vision of the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality [1], to improve sustainability of the agricultural sector. However, this shift towards circular agriculture asks for a shift in resources used for animal feeds; from highly digestible cereal grains and oilseeds(products), to food waste and agricultural by-products that do not compete with resources for human consumption or energy production. These products typically have a lower nutritional value due to their high fiber contents and poor protein digestibility. For instance, the (small intestinal) protein digestibility of soybean meal typically is 88%, whereas that of rapeseed meal (a by-product from rape oil for human consumption and biofuel) is only 73% and that of sunflower seed meal is 80% [2]. Products like rapeseed meal and sunflower seed meal are already used in pig feeds, but their abundance is expected to increase substantially, because of a decrease in the use of human-edible resources in pig feeds. In addition, the food industry is continuously searching for refined products with increased nutritional value for humans by modifying extraction and processing conditions, resulting in lower nutritional value of the by-products available for pig feeds. Hence, feeding these future protein sources (including even further processed by-products or novel protein sources such as cottonseed meal or algae) to pigs will likely lower the small intestinal protein digestibility, leading to a greater flow of protein into the hindgut. In the hindgut, these proteins are preferred substrates for saccharo-proteolytic bacteria (such as Clostridia, Proteus and *E. coli*) resulting in the proliferation of these bacteria, some of which are known pathogens. When these undigested proteins are fermented, metabolites such as branched-chain fatty acids, ammonia, phenolic and indolic compounds, hydrogen sulfide, biogenic amines and nitric oxide and N-nitroso compounds are produced. Although some of these protein fermentation metabolites, e.g. polyamines, are important for gut function in lower concentrations, many of these metabolites have potential damaging effects on gut function [3-7]. In this way, the use of poorly-digestible protein sources might therefore negatively affect gut health. This is especially of importance in young animals, where the microbial community is not yet fully established and the gut wall is still developing and not resilient yet. It is, therefore, of great importance to evaluate the effects of diets with poorly digestible proteins/fractions on the intestinal microbiota, intestinal function, and overall health of piglets and gain more understanding of the nutritional value of future pig feed resources.

The extent to which ingested proteins escape small intestinal digestion and are prone to microbial degradation depends on the environmental conditions under which the piglets are kept. For instance, it has been demonstrated that pigs kept under low sanitary conditions (resulting in pigs with a chronically activated immune system, but without clinical signs of illness) have a reduced protein digestibility compared with pigs kept under high sanitary conditions [8-9]. The exact underlying mechanisms are unknown, but this is likely mediated via the microbiota. Experimental differences in sanitary conditions also reflect differences in environmental conditions which are known to occur in pig husbandry. Although it is known that such sanitary conditions can affect protein digestibility, it is, however, unknown whether sanitary conditions interact with the effects of undigested proteins on intestinal function and health in piglets.

The first aspect to study in this project is, therefore, how protein fermentation and sanitary conditions affect intestinal function and health of piglets. It is hypothesized that both protein

fermentation and low sanitary conditions negatively affect intestinal health, but that these two factors combined have a greater negative impact on intestinal health.

Apart from the reduction in protein digestibility and the presumable negative effects on intestinal function and health, the shift towards increased use of fiber-rich feed resources will inevitably also lead to increased inclusion levels of fibers and different protein fractions. It is known that fibers may interfere with various digestive process, such as nutrient accessibility, bulking properties, microbial activity, gut physiology and function, endogenous secretions, and flow of digesta through the gastro-intestinal tract, thereby affecting nutrient digestion and gut health. Interestingly, such fiber-structures could have the potential to steer protein fermentation and thereby alleviate potential negative effects on gut health. Problematically, the exact effect of the various fiber and protein structures found in unconventional or further processed feed resources are not well defined, hampering the prediction of the nutritional value of such diets. Accurate prediction of small intestinal digestion and fermentation and the effect on the intestinal wall of these unconventional feed resources is paramount for designing (young) pig feeds based on high concentrations of high-fiber high-protein by-products that maximize the conversion of these resources into edible products while minimizing the negative impact on gut health.

The second aspect addressed in this project is, therefore, how fiber and protein fractions (separately or combined) from agricultural by-products affect digestive processes as digesta transit, nutrient digestibility, and microbial colonization. It is hypothesized that both fiber and protein fractions affect digestive processes, and that interactions effects occur.

In this project, the overall objectives are to evaluate the effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal function and health of piglets and how fiber-and protein level and structure from agricultural by-products affect digestive processes in pigs. With this basic and applied knowledge, (dietary) strategies could be designed to accommodate the shift in feed resources while maintaining adequate intestinal function and health of piglets, when moving into an era of circular agriculture.

References

1. Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. 2018. Landbouw, natuur en voedsel: waardevol en verbonden. Nederland als koploper in kringlooplandbouw. www.rijksoverheid.nl/ministeries/ministerie-van-landbouw-natuur-en-voedselkwaliteit/documenten/beleidsnota-s/2018/09/08/visie-landbouw-natuur-en-voedsel-waardevol-en-verbonden.
2. CVB Veevoedertabel 2018. Chemische samenstellingen en nutritionele waarden van voedermiddelen. www.cvbdiervoeding.nl
3. Lin HC, Visek WJ. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. J Nutr. 1991;121:887-93.
4. Hughes R, Kurth MJ, McGilligan V, McGlynn H, Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. Nutr Cancer. 2008;60:259-66.

5. Andriamihaja M, Lan A, Beaumont M, Audebert M, Wong X, Yamada K, Yin Y, Tomé D, Carrasco-Pozo C, et al. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2015;85:219-27.
6. Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, Khodorova N, Audebert M, Blouin J, Grauso M, Lancha L, Benetti P, et al. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. *Free Radic Biol Med.* 2016;93:155-64.
7. Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottière HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso M, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, et al. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1725:201-12.
8. Kampman-van der Hoek E, Jansman AJM, van den Borne JJGC, van der Peet-Schwering CMC, van Beers-Scheurs H, Gerrits WJJ. Dietary Amino Acid Deficiency Reduces the Utilization of Amino Acids for Growth in Growing Pigs after a Period of Poor Health. *J Nutr.* 2016;146:51-58.
9. van der Meer Y, Lammers A, Jansman AJM, Rijnen MMJA, Hendriks WH, Gerrits WJJ. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. *J Anim Sci.* 2016;94:4704-4719.

3.2 Purpose

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

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

The main objectives of this project are to evaluate the effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal function and health of piglets and how fiber- and protein level and structure from agricultural by-products affect digestive processes in pigs.

We aim to reach this objective through a series of piglet studies, described in 3.4.

The specific key research questions to be studied are:

1. How does protein fermentation affect intestinal function and health of piglets, and is this effect dependent on sanitary conditions?
2. How do fiber and protein fractions from agricultural by-products affect digestive processes as digesta transit, nutrient digestibility, and microbial colonization, and do these fiber- and protein fractions have interacting effects?

We expect to reach our main project's objective, because the scientific partners have extensive expertise in the research areas (i.e. animal nutrition, microbiology, host physiology/metabolism, metabolomics tools) required within this project. In addition, we collaborate with an industrial partner, who is a global leader in additives for animal feed and serves animal feed producers worldwide with products and formulation services, and is a direct stakeholder for the utilization of newly gained knowledge.

3.3 Relevance

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

In the Netherlands, there is a focus to change towards circular agriculture, as indicated in the vision of the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality. An increased use of regional resources and (highly-processed) by-products is aimed for. This results in changes in the diets of production animals. This project will provide insight into digestive processes of such diets and how they affect intestinal function and health of piglets and how this is influenced by environmental conditions. With this knowledge, (dietary) strategies could be designed to accommodate the shift in feed resources while maintaining adequate intestinal function and health of pigs, when moving into an era of circular agriculture.

3.4 Research Strategy

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

The overall design of the project is illustrated in figure 1.

The diets of pigs are expected to change within a circular agricultural system. Diets for piglets in the future are expected to have a poorer protein digestibility, which will increase the flow of protein into the hindgut of piglets. The effects of the resulting increase in protein fermentation on the microbiota composition, intestinal wall, and health of the piglets - depending on sanitary conditions the piglets are exposed to (as described in paragraph 3.1) - are evaluated in appendix 1.

In addition to poor protein digestibility, the shift towards increased use of fiber-rich feed resources will inevitably also lead to increased inclusion levels of fibers and different protein fractions. The (interacting) effects of fiber and protein structures found in unconventional feed resources on digestive processes, such as digesta transit, nutrient digestibility and microbial colonization are evaluated in appendix 2.

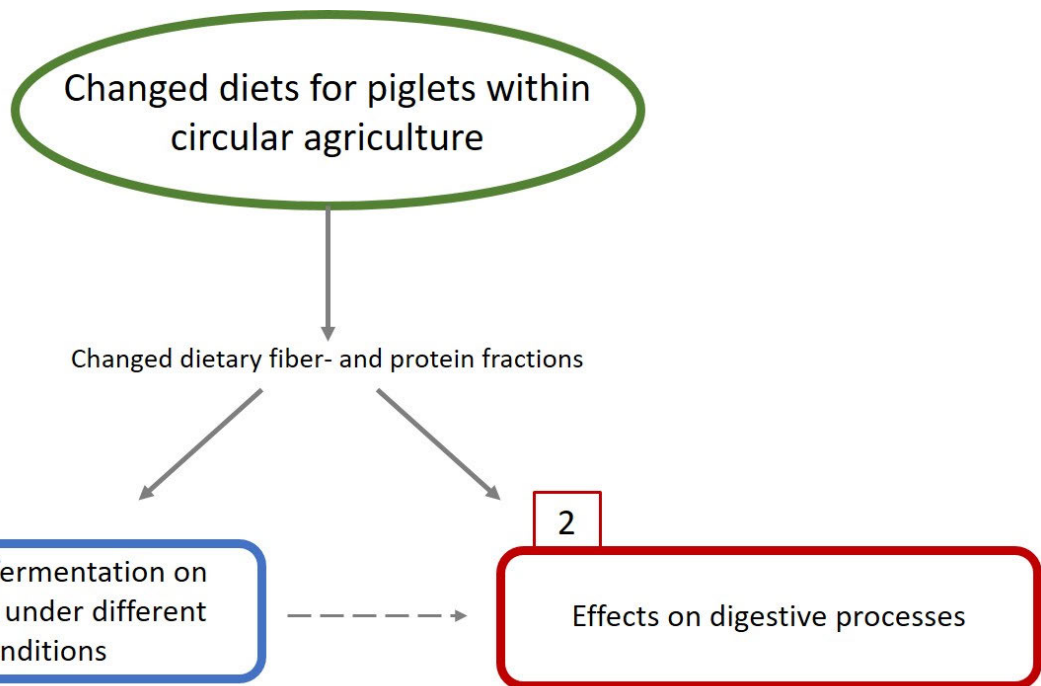


Figure 1. Overall design of the project. The diets of pigs are expected to change within a circular agricultural system (green box), resulting in changes in fiber- and protein fractions. The proteins are expected to have a poorer digestibility, resulting in protein fermentation. The effects of protein fermentation and the potential interaction with sanitary conditions is evaluated in appendix 1 (blue box). Effects of changed dietary fiber- and protein fractions on digestive processes will be evaluated in appendix 2 (red box). Intestinal tissue samples are collected in appendix 2, and based on the outcome of appendix 1 (i.e. if protein fermentation is found to affect intestinal function), intestinal function is evaluated in appendix 2 as well (grey dashed arrow). In addition, the potential effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal function are likely mediated via the microbiome. Fiber- and protein fractions can steer the microbiome, and with that digestive processes.

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.

Two appendices are included in this project to answer the research questions as described in paragraph 3.2.

Appendix 1: Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions

This experiment is designed in a 2 x 2 factorial arrangement with diet (high or low protein fermentation) and sanitary conditions as factors. To evaluate effects on microbiota composition and protein fermentation products, feces will be collected daily. To evaluate effects on intestinal function, ileal digestibility and digesta protein fermentation products, a sub-set of piglets is dissected for the collection of intestinal tissues and digesta samples. Overall performance is evaluated by measuring body weight gain and feed intake, and by registering daily clinical health.

Appendix 2: Digestibility experiment with young pigs

In this type of animal procedure, pigs are fed with diets differing in fiber and protein fractions, as expected within circular agriculture systems and effects on digestive processes, such as digesta transit, nutrient digestibility, and microbial colonization are evaluated. Pigs are fed these diets and fecal samples are collected for evaluating total tract digestion. Subsequently, pigs are housed

individually and frequently fed to obtain steady-state conditions in the gastro-intestinal tract. Thereafter, pigs are dissected for the collection of digesta and tissue samples along the gastro-intestinal tract to determine ileal nutrient digestibility and passage kinetics.

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

The experiments described in the appendices all relate to the effects of changed dietary composition (related to circular agriculture) and are conducted in parallel.

The effects of a poorer protein digestion and the (interacting) effect of sanitary conditions on intestinal function and health in piglets are evaluated in appendix 1. This basic knowledge will increase our understanding of how an increased use of feed resources with a poorer protein digestibility will affect intestinal function in piglets.

The effects of diets with a changed composition on digestive processes are evaluated in appendix 2 and will increase our understanding and prediction of small intestinal digestion and fermentation of unconventional feed resources which is required for designing future pig feeds.

Intestinal tissue samples upon dissection will be collected in appendix 2 (depending on dietary contrast). An important selection step is to decide to evaluate the potential effects of diets in appendix 2 on intestinal function. This depends on the results obtained in appendix 1. If protein fermentation indeed affects intestinal function as evaluated in appendix 1, then it is of importance to include measurements on intestinal function in appendix 2 as well.

Milestones include knowledge on how protein fermentation and environmental conditions relate to intestinal function and health of piglets and quantitative digestibility and passage behavior data of novel/changed diets for pigs.

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	Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions
2	Digestibility experiment with young pigs

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400					
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University					
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="443 1021 619 1059">Serial number</th> <th data-bbox="935 1021 1433 1059">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="443 1059 619 1288">1</td> <td data-bbox="935 1059 1433 1288">Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions	
Serial number	Type of animal procedure						
1	Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions						

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 objective is to determine how protein fermentation and sanitary conditions affect intestinal function and health of piglets.

The experiment is designed as a 2 x 2 factorial arrangement. Factors are diet (inducing more or less protein fermentation, for instance by using protein sources differing in digestibility, using different protein inclusion levels or applying heat treatment a protein source to reduce protein digestibility) and sanitary conditions (reflecting differences in microbial pressure as found in practice) as factors. Low sanitary conditions are created by spreading feces or manure from commercial pig farms in the pens.

Piglets (n = 40 per treatment) arrive at the facilities at weaning and the experiment will last 2 weeks. The experiment will be performed over multiple batches in the climate-controlled respiration chambers. Housing in the climate-controlled respiration chambers is desired for strict separation of the sanitary conditions per unit. In addition, this allows measurements of energy metabolism. Feces will be collected daily, to evaluate effects of treatments on microbial composition, protein fermentation metabolites and markers of gut health (e.g. calprotectin). To evaluate effects on intestinal function a sub-sample of the piglets (n = 20 per treatment) will be dissected for intestinal tissue collection. The dissection of the sub-sample of piglets is timed when the largest effects on intestinal function are expected (e.g. at day 7 after arrival). The piglets that are not dissected, will remain in the climate-controlled respiration chambers until day 14 to evaluate effects on the microbiota and overall health and performance of piglets.

Primary output parameters include ileal and total tract nutrient digestibility, fecal and digesta protein fermentation metabolites and microbial composition, parameters of intestinal function (intestinal morphology, intestinal barrier function, fecal calprotectin), stress markers (salivary cortisol), and energy metabolism and performance (body weight gain, feed intake, feed efficiency). In addition to feed intake at pen level, individual feed intake will be estimated using video recordings and a dual marker technique at two time points in the experiment. Individual feed intake will – together with the digestibility of the proteins – determine the flow of protein into the hindgut and can, therefore, contribute to the effects on intestinal function and health. With the dual marker technique, piglets will be dosed with a reference marker (in a feed pellet) 3 times daily for 2 days and fecal spot samples are collected twice on one day (i.e. 1 time period). Another marker will be included in the feed (to which piglets have ad libitum access), and the ratio between the reference marker and the feed marker in the feces can be used to calculate feed intake. Piglets will be administered with the pellet with reference marker by hand and are trained for 2 days before the measurement starts to eat this pellet by hand feeding.

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

The sanitary challenge (low sanitary conditions, LSC) is applied to 2 treatment groups (n = 80 piglets). The sanitary challenge will be similar to van der Meer et al. (2016). Feces or manure from commercial pig farms will be regularly spread in the pens of LSC piglets. Bacterial species have been associated with decreased intestinal health of piglets (van der Hee et al., unpublished) and will be mixed with the feces that is spread to standardize the challenge and increase the contrast between LSC and the non-challenged groups (high sanitary conditions; HSC). HSC piglets will be housed in thoroughly cleaned and disinfected pens.

In order to evaluate the effects of diet and sanitary conditions on nutrient digestibility, intestinal function and health, the following measurements are included:

For 80 piglets:

- Daily rectal fecal collection (7 days)
- Saliva collection (7 days)
- Body weight (2 times)

- Feeding marker (3x for 2 days) and collecting rectal fecal sample twice a day (1x)
- Dissection (once)

For 80 piglets:

- Daily rectal fecal collection (14 days)
- Saliva collection (14 days)
- Body weight (3 times)
- Feeding marker (3x for 4 days) and collecting rectal fecal sample twice a day (2x)

To obtain rectal fecal samples, piglets are handled/picked-up. If a piglet does not defecate during handling, the fecal sample is collected via manual stimulation, by carefully entering the anus and gently stimulating the rectal ceiling (max. of 2 minutes) to stimulate defecation. A maximum of 3 attempts is used per piglet in order to obtain the rectal fecal sample.

Saliva is collected by taking a swab from the oral cavity of the piglets. Collection of saliva and feces will be combined as much as possible to minimize handling of the piglets.

Piglets will be euthanized in order to collect intestinal wall and digesta samples. Laboratory analyses will be conducted in the obtained samples to determine the effects of the treatments.

Reference

van der Meer, Lammers, Jansman, Rijnen, Hendriks, and Gerrits. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. *J Anim Sci* (2016) 94:4704-4719.

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

Power analyses have been used to estimate the minimal number of piglets required to detect differences in intestinal and microbiota parameters, which are important read-out parameters in this experiment. For instance, using crypt depth in the distal colon of piglets with and without intestinal problems (Gilbert et al., 2019) in a power analysis, the minimum number of piglets per treatment is 17 to obtain a power of 0.819. Using fecal concentration of ammonia (a product produced when protein is fermented; Gilbert et al., 2019) results in a requirement of 34 piglets per treatment to obtain a power of 0.8. To detect differences between treatments in fecal microbiota composition in weaned piglets, we expect to require 40 piglets per treatment, based on experience and a previous experiment (van der Hee et al., unpublished). Therefore, we will use 40 piglets per treatment in total, of which 20 piglets will be used for measurements of intestinal function and ileal digestibility following dissection.

Reference

Gilbert, M. S., B. van der Hee, and W. J. J. Gerrits. 2019. The role of protein fermentation metabolites in post-weaning diarrhoea in piglets. Pages 361 - 362 in 6th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Belo Horizonte, Brazil. M. L. Chizzotti, ed. Wageningen Academic Publishers.

B. The animals

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

Piglets will be used in this experiment, because this is the target animal. This experiment is aimed at evaluating the (interacting) effects of diet and sanitary conditions on intestinal function and health, and no appropriate non-animal model is available.

Piglets (n = 160), divided over multiple batches, will be collected from a commercial pig farm at weaning, transported to the experimental facilities and remain at the experimental facilities for 2 weeks. The objective of this study is to evaluate (interacting) effects on intestinal function, which is expected to be highest at 7 days after weaning. For instance, intestinal villi length was affected by a pathogen challenge in piglets at day 7 after weaning, but not a day 14 (Heo et al., 2010). However, for microbial composition, protein fermentation and post-weaning performance, 14 days are taken

into account. For instance, rectal ammonia and short-chain fatty acids (fermentation products) concentrations were higher at day 14 than at day 7 after weaning (Heo et al., 2010).

Reference

Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2010. Feeding a diet with a decreased protein content reduces both nitrogen content in the gastrointestinal tract and post-weaning diarrhoea, but does not affect apparent nitrogen digestibility in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim. Feed. Sci. Technol. 160:148-159.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: piglets are the target animal. This experiment is aimed at evaluating the (interacting) effects of diet and sanitary conditions on microbiota composition, intestinal function and health, and no appropriate non-animal model is available due to the complex interaction between these parameters in vivo.

Reduction: the number of animals is based on power analyses and previous studies focused on intestinal parameters.

Refinement: piglets will be group-housed and receive toys as environmental enrichment. Killing of the piglets will be performed by skilled personnel to minimize stress.

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

All animal handling procedures will be conducted by experienced staff (feeding, weighing, transport). Various, non-destructible toys will be made available to the pigs as environmental enrichment, and toys will be alternated regularly.

Nutrient digestion, microbial composition, and protein fermentation are primary output parameters in this study. Therefore, antimicrobial treatments should be withheld, because these will affect microbial composition and microbial metabolite production and their potential effect on intestinal function and health. In case of severe clinical sickness, there will be discussion between researchers, animal caretakers, and a veterinarian to determine if measures are required. In that case, a piglet can be treated (and removed from the experiment) or euthanized.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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.

To the best of our knowledge, the interactive effects of dietary protein and sanitary conditions on intestinal function and health have not been studied previously. If newly published papers indicate novel insights in the topic that have not been taken into account but are of relevance for the proposed experimental design, experimental procedures will be reconsidered.

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 piglets are checked daily by a qualified person and sick piglets will be noted (for instance diarrhea). However, piglets cannot be treated with antibiotic treatment, because this will interfere with the primary output parameters.

The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs (in an unknown quantity) and can interfere with the dietary treatments and output parameters (nutrient digestion, microbiota, protein fermentation). Pigs will receive toys as enrichment.

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.

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

Piglets that will be dissected will be sedated prior to anesthesia / euthanasia. Sedation will be via i.m. injection, and piglets can experience minor and short-term pain from i.m. sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

A previous study using similar contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2016) did induce differences in subclinical health status. In those studies, no adverse effects of the low sanitary status on animal welfare were found. Because of the addition of bacteria to the feces/manure that is spread in the pens of the low sanitary conditions, potential clinical signs of sickness (diarrhea) can occur. Diarrhea can also occur due to the feeding of a diet with a lower protein digestibility. No antimicrobial treatments should be provided, because these will interfere with the main measurements. This might result in a higher incidence or severity of clinical sickness (e.g. diarrhea).

Reference

van der Meer, Lammers, Jansman, Rijnen, Hendriks, and Gerrits. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. J Anim Sci (2016) 94:4704-4719.

Explain why these effects may emerge.

The potential adverse effects can occur due to the experimental treatments and by withholding antimicrobial treatments which are required aspects of this experimental design.

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

Antimicrobial treatments cannot be applied because these treatments will interfere with the measurements. No specific measures are taken to minimize adverse effects, but piglets will be inspected daily. In case of clinical signs of sickness, there will be discussion between researchers, animal caretakers and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. In that case, a piglet can be treated (and removed from the experiment) or euthanized.

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.

Based on a similar sanitary conditions model (van der Meer et al., 2016), the procedures are not likely to require humane endpoints. Clinical signs in this experiment might be higher compared to previous sanitary condition studies (described at 'I'). Therefore, in case of sick piglets, there will be discussion between researchers, the animal caretaker and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. For instance, piglets can be treated with painkillers when required. Furthermore, when antibiotic treatment is required in the expert opinion of a veterinarian, the piglet is removed from the trial.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of humane endpoints is estimated at <5%.

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 cumulative discomfort in this experiment is estimated to be mild.

- No bedding (mild)
- Risk of diarrhea related to experimental treatments (mild)
- Rectal fecal sampling (mild)
- Saliva sampling (mild)
- Sedation previous to dissection (mild)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

A sub-sample of piglets will be killed in order to collect the required 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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Digestibility experiment with young pigs</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Digestibility experiment with young pigs
Serial number	Type of animal procedure					
2	Digestibility experiment with young 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.

Diets for pigs are expected to change within a circular agriculture system. Increasing use of regional (fiber-rich) agricultural by-products or even further processed by-products will alter the dietary composition, with unknown effects on various digestive process, such as digesta transit, microbial colonization, and nutrient digestibility; and with that nutrient and energy availability for the pig. Therefore, the overall objective is to evaluate the digestibility and digesta passage kinetics of such diets.

Diets, based on various agricultural by-products (such as oilseed meals and cereal by-products from the milling industry) are used in digestibility studies. Pigs will be fed the diets for four weeks after which the digesta passage kinetics and ileal digestibility will be measured following dissection. Primary output parameters are ileal and total tract nutrient digestion, digesta passage kinetics, and performance (body weight gain, feed intake, efficiency).

Considerable research is being conducted worldwide regarding nutrient digestion of feed ingredients. In this appendix, in addition to digestibility measurements, we include measurements on digesta passage kinetics and fermentation characteristics as well, which are often not evaluated in general digestion trials. Digesta passage kinetics are of importance for accurate prediction of the nutritional value of diets within a circular agriculture and to evaluate the potential effect on (gut) health in a response to an overflow of nutrients into the large intestine. Therefore, intestinal tissue samples are collected upon dissection as well, to evaluate potential effects on intestinal function, if deemed of importance based on the results from appendix 1.

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

In order to determine total tract nutrient digestibility, rectal fecal samples are collected multiple times per pig (6 times at max) following feeding of an indigestible marker in the feed. For evaluating performance, body weight of pigs is determined 5 times. To determine ileal digestibility and passage along the gastro-intestinal tract, pigs are dissected for the collection in digesta samples, following feeding of indigestible markers. In order to obtain a steady-state in the gastrointestinal tract, pigs will be frequently fed (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). At maximum 48h before dissection, pigs will be housed individually and will be adapted to frequent feeding.

To obtain rectal fecal samples, pigs are handled/fixated. If a pig does not defecate during handling, the fecal sample is collected via manual stimulation, by carefully entering the anus and gently stimulates the rectal ceiling (max. of 2 minutes) to stimulate defecation. A maximum of 3 attempts is used per pig per sampling moment in order to obtain the rectal fecal sample.

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

The number of pigs required per dietary treatment is based on previous digestibility studies. For determining total tract and ileal digestibility of nutrients, 8 piglets per treatment were required (Bikker et al., 2006; Heo et al., 2008). Our experience with using more fiber-rich by-products is that the variation in digestibility is higher, and, therefore, 10 pigs per treatment are estimated to be required. Overall, we estimate to evaluate 10 dietary compositions, which results in a total of 100 pigs.

References

Bikker, P., A. Dirkzwager, J. Fledderus, P. Trevisi, I. le Huërou-Luron, J. P. Lallés, and A. Awati. 2006. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 84:3337-3345.
Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2008. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. *Arch. Anim. Nutr.* 62(5):343-358.

B. The animals

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

In total, 100 young pigs will be used to evaluate nutrient digestibility and digesta passage kinetics. Pigs will be obtained from a commercial pig farm and the experimental procedures will last 5 weeks at max. Pigs are used in this experiment, because this is the target animal. Although digestibility can be estimated using *in-vitro* techniques, the complex interactions between ingredients, the microbiota and passage cannot be determined with *in-vitro* techniques. Therefore, this will be tested using *in-vivo* experiments.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: pigs are the target animal. Although digestibility can be estimated using *in-vitro* techniques, the complex interactions between ingredients, the microbiota, and digesta passage cannot be determined with *in vitro* techniques. Therefore, this will be tested using *in-vivo* experiments.

Reduction: the number of animals is estimated from previous digestibility studies.

Refinement: pigs will be group-housed for the major part of the study and the duration of individual housing is limited to a maximum of 48h to minimize discomfort. During individual housing, pigs will be able to see and hear each other, have snout contact and will receive toys as enrichment. Killing of the pigs will be performed by skilled personnel to minimize stress.

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

All animal handling will be performed by skilled staff. Various, non-destructible toys will be available to the pigs as environmental enrichment, both during group- and individual housing, and will be alternated regularly. No exceptional adverse effects of this experiment on the environment are expected.

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.

Transition towards circular agriculture is an on-going topic, with new (nutritional) challenges occurring regularly. Digestibility and digesta passage kinetics within such novel diets are not well defined. Before conducting a digestibility study, a new literature search will be performed and experimental treatments or procedures will be reconsidered in case of novel insights from newly published papers.

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.
-

Housing and care is according to Annex III, except, when pigs are housed individually in pens (48h at max). Individual housing is needed to make sure that every animal consumes feed at each time point a meal is given (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. The pigs will be housed on partially-slatted floor pens with rubber mats. The floor area of the pens in which pigs will be individually housed, will be min. 2 m², allowing the pigs to move around freely. Bedding material is not provided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Rubber mats will be removed 3 days before individual housing, because pigs consume pieces of rubber mat as well (as occurred during a previous pig experiment). During individual housing, pigs will be able to see and hear each other and have snout contact. Animals will receive toys as enrichment.

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.

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

Pigs will be dissected, and will be sedated prior to anesthesia / euthanasia. Sedation will be via i.m. injection, and pigs can experience minor and short-term pain from this i.m. injection.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The dietary treatments might result in an increased passage or fermentation in the intestinal tract, leading to intestinal problems, such as diarrhea.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge as part of the dietary treatments

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

In case of diarrhea related to dietary treatment, feed supply can be reduced to minimise these adverse effects.

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.

Circumstances requiring humane endpoints are not expected as a result of the animal procedures. Clinical illness unrelated to the dietary treatments, as observed in general in pig husbandry, can occur. In case of sick pigs, there will be discussion between researchers, the animal caretaker and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of humane endpoints is estimated to be below 5%.

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 level of discomfort is estimated at mild, based on individual housing with snout contact (48h), rectal fecal sampling, no bedding material, risk of diarrhea related to experimental treatments and sedation prior to dissection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Pigs will be killed and dissected, which is necessary to obtain samples for digestibility and passage measurements.

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

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Het evalueren van dieeteffecten op darmgezondheid in varkens
1.2	Looptijd van het project	1-9-2020-1-9-2025
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Dieet, darmgezondheid, darmfunctie, vertering, varkens

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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

3 Projectbeschrijving

<p>3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)</p>	<p>In Nederland is een transitie richting kringlooplandbouw gaande, om de impact van de landbouw op het milieu en de natuur te verlagen. Een van de manieren om aan kringlooplandbouw bij te dragen is om grondstoffen en bijproducten uit de akkerbouw, tuinbouw en veehouderij in een zo regionaal mogelijke keten te gebruiken. Dit heeft gevolgen voor de samenstelling van de voeding voor landbouwhuisdieren, waaronder varkens.</p> <p>Eén gevolg zal verandering in de eiwitcomponent van het voer zijn. Eiwit is een belangrijke component, omdat het de bouwstenen levert voor groei. De eiwitbronnen beschikbaar in de kringlooplandbouw worden minder goed verteerd in de dunne darm van biggen. Wanneer voereiwit niet volledig wordt verteerd in de dunne darm, komt dit in de dikke darm terecht, waar het eiwit door bacteriën wordt afgebroken. Dit heeft mogelijk negatieve effecten op darmfunctie en gezondheid van biggen. Deze effecten zijn waarschijnlijk afhankelijk van de omgevingsomstandigheden waarin de varkens gehuisvest zijn, omdat deze omstandigheden een effect hebben op de bacteriën in de darm van de varkens. Daarom zullen de effecten van eiwitfermentatie en omgevingsomstandigheden op darmfunctie en gezondheid bepaald worden.</p> <p>Een tweede gevolg voor de voeding van varkens met het gebruik van nieuwe (lokale) bijproducten of meer bewerkte bijproducten is een hoger aandeel aan vezels of de inclusie van andere vezel-structuren en eiwit-structuren. De effecten van voer met dergelijke producten, met een hogere en andere soort vezel- en eiwit-fractie ten opzichte van gangbare voeringrediënten, op de vertering in de dunne darm zullen in kaart gebracht worden.</p> <p>Het doel van dit project is om in varkens de effecten van een andere voersamenstelling als gevolg van kringlooplandbouw op verteringsprocessen en darmgezondheid te evalueren.</p>
<p>3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p>	<p>In dit project zal kennis verkregen worden over verteringsprocessen en darmgezondheid in varkens in relatie tot voeders in de kringlooplandbouw. Deze kennis is nodig om (voer)strategieën te ontwikkelen binnen de voedingsuitdagingen die de kringlooplandbouw met zich meebrengt.</p>
<p>3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p>	<p>In dit project worden in totaal 260 varkens gebruikt.</p>
<p>3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p>	<p>In dit project zullen varkens gevoerd worden met voeders met verschillende samenstelling, soms onder variërende omgevingsomstandigheden. Vervolgens worden monsters verzameld om de effecten hiervan te bepalen. Dieren zullen ongerief ondervinden als gevolg van hanteren (voor het wegen van dieren en verzamelen van speeksel), het nemen van rectale mestmonsters en het verdoven voor het doden van de dieren voor het eenmalig verzamelen van darminhoud en darmwand. Daarnaast zal ongerief gepaard gaan met tijdelijke (48 uur) individuele huisvesting.</p>

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het ongerief wordt ingeschat als licht.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Waar mogelijk zullen de dieren de voedselketen ingaan. De dieren die worden geëuthanaseerd voor het verzamelen van darmmonsters zullen naar de destructie gaan.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	In dit project is het varken het doeldier. De interacties tussen voeding, enzymen en bacteriën in de darm, de darmwand en het dier zijn erg complex en kunnen niet bepaald worden met een proefdiervrij model.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Voor elk experiment is het minimale aantal dieren bepaald dat nodig is om een betrouwbaar antwoord te krijgen op de onderzoeksvraag. Hiervoor is gebruik gemaakt van informatie uit de literatuur.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	In dit project is het varken het doeldier en de interacties tussen voeding, enzymen en bacteriën in de darm, de darmwand en het dier zijn erg complex en kunnen niet bepaald worden met een proefdiervrij model. Verfijning wordt toegepast door varkens zoveel mogelijk in groepen te huisvesten, afleidingsmateriaal in de (groeps- en individuele) hokken te verstrekken en door te zorgen dat varkens elkaar kunnen zien, horen en ruiken tijdens individuele huisvesting.

4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

- Tijdens de experimenten zullen de dieren dagelijks gecontroleerd worden door gediplomeerde en bekwame dierverzorgers.
- In geval van ziekte of ongerief anders dan voorzien is in het proefplan, zal een dierenarts worden geraadpleegd en na overleg bepaald worden of een dier moet worden behandeld of uit de proef gehaald moet worden.
- Het hanteren van dieren, het verzamelen van mestmonsters en het verdoven en euthanaseren van dieren wordt gedaan door bekwaam personeel om zo weinig mogelijk stress te veroorzaken.
- Varkens krijgen afleidingsmateriaal in de hokken en dit wordt regelmatig vervangen, zowel bij groeps- als bij individuele huisvesting.
- Tijdens individuele huisvesting kunnen varkens elkaar zien, horen en ruiken.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling
achteraf

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 17 april 2020 09:59
Aan: dec@wur.nl
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD1040020209705
Bijlagen: NTS_ontsmet.pdf; 2020.W_0012_PP_lvd2.pdf; Aanvraag_tek.pdf; 2020.W_0012_DAP_lvd2.pdf

Geachte leden van DEC Wageningen UR

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" en aanvraagnummer: AVD1040020209705.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 17-04-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 17-04-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1040020209705
2. Titel van het project: Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs
3. Titel van de NTS: Het evalueren van dieeteffecten op darmgezondheid in varkens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
5.1 lid2e
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 17-04-2020
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 20-04-2020 en 18-05-2020
Anderszins behandeld: n.v.t.
Termijnonderbreking(en): 24-04-2020 t/m 07-05-2020 en 27-05-2020 t/m 10-06-2020
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 07-05-2020 en 10-06-2020
Advies aan CCD: 12-06-2020
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: 24-04-2020

Datum *antwoord*: 07-05-2020

- a. De DEC heeft twijfels over de herhaalbaarheid, nawerkbaarheid en toetsbaarheid van het eerste deel van dit project. De sanitaire interventie door mest binnen te halen van andere bedrijven brengt verschillende risico's met zich mee. In de mest kunnen ziektekiemen zitten die het verloop van de proef beïnvloeden. Omdat de samenstelling van mest varieert tussen bedrijven en in de tijd is de vraag gerechtvaardigd hoe representatief en relevant de steekproef is en hoe een experiment herhaald kan worden onder dezelfde condities. Gezien deze opmerkingen vraagt de DEC zich af of onderzoekers niet beter met de experimenten uit bijlage 2 kunnen starten, gevolgd door een veldstudie op bedrijven met verschillende hygiënestatus. Indien u blijft bij uw voornemen de experimenten uit bijlage 1 uit te voeren zoals beschreven in bijlage 1, wat is dan de translatie van de verkregen gegevens naar de praktijk?
Wij zien zeker de meerwaarde van veldstudies bij bepaalde onderzoeksvragen. Dit is door ons daarom ook al eerder gedaan om variatie in gezondheidsstatus op bedrijven (Kampman - van de Hoek, 2015) en de relatie met o.a. eiwitvertering (zie Sakkas et al., Livestock Research rapport 'Relatie tussen bedrijfsgezondheidsstatus, technische resultaten en aminozuur stofwisseling bij vleesvarkens, 2016; bijgesloten) in kaart te brengen. Voor deze veldstudie selecteerden wij zes bedrijven met verschillende gezondheidsstatus volgens de methode zoals beschreven in het proefschrift van Kampman - van de Hoek (2015). Hoewel deze studie relevante informatie gaf over de variatie in o.a. eiwitvertering in praktijkomstandigheden, was deze variatie niet gerelateerd aan de gezondheidsstatus van het bedrijf. Daarnaast correspondeerden ook de verschillende immuun-parameters gemeten in bloedmonsters van individuele

DEC-WUR

DATUM

16 juni 2020

ONDERWERP

Advies DEC-WUR
AVD1040020209705

POSTADRES

Postbus 9101
6700 HB Wageningen

INTERNET

www.WUR.nl

CONTACTPERSOON

5.1 lid2e

TELEFOON

5.1 lid2e

E-MAIL

DEC@wur.nl

varkens gedurende de proefperiode, niet met de vooraf ingeschatte bedrijfsgezondheidsstatus (geschat over een periode van 1 jaar). Het vooraf inschatten van de gezondheidsstatus van een bedrijf biedt dus geen garantie op een contrast in gezondheidsstatus in de periode van meten, tussen de studie-individueen. Wij denken dat het opleggen van een experimenteel contrast in sanitaire condities daarom geschikter is om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.

Naar aanleiding van de resultaten uit deze veldstudie zijn wij begonnen met het bestuderen van effecten van chronische, milde activering van het immuunsysteem met sanitaire condities, een variant op eerder gepubliceerd onderzoek bij INRA (zie review Pastorelli et al., 2012) en in de USA (Williams et al., 1997). De samenstelling van mest kan inderdaad variëren tussen bedrijven en over tijd, maar met de sanitaire interventie kunnen we een gecontroleerd, praktisch relevant contrast aanbrengen. Inmiddels hebben we in verschillende projecten 4 experimenten gedaan met een contrast in sanitaire condities (1 studie met vleeskuikens, Hollemans et al., unpublished en 3 studies met varkens, van der Meer et al., 2016 en 2020, en van der Peet-Schwering et al., unpublished). De resultaten uit de niet gepubliceerde studies zijn desgevraagd beschikbaar. In alle 4 de studies is het gelukt om een voldoende groot contrast te creëren met deze interventie. Daarnaast leidde het contrast tot verschillen in subklinische gezondheid en NIET tot klinische problemen. Dit maakt deze benadering interessant, vertaalbaar naar de praktijk, maar ook een goed wetenschappelijk model voor de impact van milde, chronische activering van het immuunsysteem. Uiteraard kan het voorkomen dat er ziektekiemen in de mest aanwezig zijn en we realiseren ons dat dit een risico kan zijn en monitoren de klinische gezondheid daarom goed. Daarnaast is het door deze variatie juist van belang om de studie over meerdere batches uit te voeren. Dit betekent dat we de mogelijke verschillen/variatie in de response op de sanitaire interventie kunnen bestuderen. Hiermee maken we dus binnen de studie een inschatting van de herhaalbaarheid en een inschatting van de variatie die er is. Uit de studie van van der Meer et al. (2020) blijkt bijvoorbeeld dat schijnbare fecale vertering van eiwit consistent lager was voor varkens gehouden in de lage sanitaire condities in alle batches. De groei van de varkens verschilde wel per batch, maar de verschillen tussen sanitaire condities was altijd in dezelfde richting met een lagere groei voor varkens gehouden bij de lage sanitaire condities. Verschillen in groeisnelheid waren in een range die normaal ook tussen bedrijven gezien wordt. Door het experiment over meerdere batches uit te voeren kunnen we dus een schatting maken van het effect van eiwitfermentatie op de darm bij verschillende sanitaire condities. Onze hypothese is dat eiwitfermentatie een (groter) negatief effect heeft op darmgezondheid wanneer biggen bij lage sanitaire condities gehuisvest zijn. Als dit zo blijkt te zijn, dan betekent dit voor de praktijk dat het voeren van diëten met meer laag verteerbaar eiwit erin een groter risico geeft op darmproblemen op bedrijven/afdelingen met een lagere status. Deze informatie draagt bij aan een betere afstemming tussen voeding en bedrijf. De resultaten van studies met andere modellen, zoals bijvoorbeeld met (steriele) infecties (E. Coli, Salmonella, LPS, CFA; zie o.a. proefschrift van Kampman - van de Hoek, 2015), zijn veel moeilijker te vertalen naar de praktijk, omdat deze zonder uitzondering responsen in de klinische range bestuderen (kortdurend, meestal met koortsrespons). Met het sanitaire status model verwachten wij een betere translatie naar de praktijk.

- b. De DEC wil u ook vragen naar de aard en kwaliteit van de rest- en bijproducten en de verwerkingsprocedures waaruit deze zijn voortgekomen; worden deze nader onderzocht? Gebruik van restproducten impliceert risico's met betrekking tot voedselveiligheid van zowel mens als dier.

De producten die gebruikt zullen worden zijn bijproducten die reeds op de markt zijn en voldoen aan de eisen voor voedselveiligheid. Momenteel worden veel bijproducten slechts in beperkte mate en met name aan vleesvarkens gevoerd. In de studies beschreven in appendix 2, zullen deze bijproducten in een hoger aandeel en/of aan jonge varkens gevoerd worden, en zal dieper ingegaan worden op verteringsprocessen en op de effecten op de darm.

- c. De DEC merkt op dat in de NTS de mogelijkheid tot neuscontact voor de dieren in solitaire huisvesting ontbreekt, dit is wezenlijk om te noemen, dus de DEC verzoekt u dit nog toe te voegen.

De mogelijkheid tot neuscontact is toegevoegd aan de NTS.

Datum vraag: 24-04-2020

Datum antwoord: 07-05-2020

DATUM
16 juni 2020

PAGINA
3 van 6

De DEC heeft grote twijfels bij uw besluit om toch mest van verschillende bedrijven te willen gebruiken (en dus met verschillende samenstelling) waardoor de kans bestaat dat een dergelijk onderzoek daardoor niet reproduceerbaar kan zijn.

Kunt u beter beschrijven wat de resultaten van eerdere onderzoeken waren en op grond waarvan u dan aanneemt dat het wel een gevalideerde werkwijze is?

Op de huidige beschreven wijze zou er immers ook sprake kunnen zijn van een infectieproef met het daarbij behorende ongerief? Welke ziektekiemen zouden er in de mest kunnen zitten en tot welke klinische ziekteverschijnselen kan dat dan leiden?

Het risico op infectie met het verspreiden van mest in de hokken schatten we laag in op basis van voorgaande studies. De studie van Van der Meer et al. (2016) bevatte 612 varkens, bestudeerd over het groeitraject van 20 – 110 kg lichaamsgewicht. Twee varkens zijn doodgegaan en 1 varken is met antibioticum behandeld. De studie van Van der Meer et al. (2020) werd uitgevoerd met 144 varkens in het gewichtstraject 6 - 30 kg, waarvan 1 big is doodgegaan vanwege volvulus. Verder waren er geen klinische symptomen en is er in die studie dus ook geen antibioticum toegediend. De studie van Van der Peet-Schwering et al. (2020) bevatte 408 varkens, en in de groeifase tot aan slacht zijn 11 varkens doodgegaan en 9 varkens gehuisvest in hoge sanitaire condities en 17 varkens gehuisvest in lage sanitaire condities kregen antibioticum toegediend. Deze behandelingen waren met name toegediend vanwege diarree of longproblemen. Geen van deze drie studies bleek dus achteraf een "infectieproef".

De mest die we willen verzamelen om in de hokken te verspreiden zullen we verzamelen op bedrijven waar geen klinische problemen zijn. Om het risico op een infectie verder te minimaliseren in onze studie, zullen we de mest die we van bedrijven verzamelen, opslaan en van tevoren te screenen (met PCR) op (toxines van) pathogenen. De batches mest met een hoge aanwezigheid van een pathogeen zullen we vervolgens niet gebruiken in de gepoolde mest die we verspreiden in de hokken. De (toxines van) pathogenen waarop we screenen zijn gerelateerd aan diarree of longproblemen (Escherichia coli (ETEC), Salmonella enterica, Campylobacter jejuni, Clostridium perfringens, Lawsonia intracellularis, en porcine reproductive en respiratory syndrome (PRRS) virus. Deze lijst met pathogenen hebben we opgesteld op basis van: 1. pathogenen welke we bepaald hebben in onze vorige veldstudie naar speendiarree, 2. een enquête onder varkensdierenartsen over voorkomende pathogenen en hun klinische impact in vleesvarkens [onderdeel van het proefschrift van Esther van der Hoek – Kampman, introductie in haar PhD thesis] en 3. discussies met microbiologen en een varkensdierenarts. Met bovenstaande aanpak zal het risico op infectie en klinische problemen geminimaliseerd worden. Daarnaast zal klinische gezondheid goed gemonitord worden in de studie.

De aanleiding voor deze studie is dat grondstoffen gebruikt in een circulaire landbouw van lagere kwaliteit zijn. Met een lage eiwitvertering van een dergelijk voer, kan dit mogelijk een negatief effect op de darm hebben, en onze hypothese is dat dit effect sterker zal zijn bij lage sanitaire condities. Dit willen we graag bestuderen om de mechanismes hierachter beter te begrijpen. We weten dat er grote verschillen zijn binnen en tussen bedrijven in bijvoorbeeld eiwitvertering en groei, terwijl hetzelfde voer gevoerd wordt en er geen klinische problemen zijn (Sakkas et al., Livestock Research rapport). Uitgangspunt voor ons is dus dat een contrast in sanitaire condities werkelijk bestaande verschillen in de praktijk nabootst zónder dat er klinische problemen zijn. Dat een contrast in sanitaire condities inderdaad verschillen in de praktijk nabootst blijkt uit de verlaging van groei en voerefficiëntie die wij zien in onze eerdere studies, en die ook gerapporteerd zijn in een review van Pastorelli et al. (2012). Deze verschillen zitten in dezelfde orde van grootte als verschillen in prestaties tussen bedrijven. Goede voeding kan nooit een oplossing zijn voor slechte huisvestingscondities, maar begrip van de mechanismes die hierachter schuil gaan is belangrijk, en aangepaste voeding helpt de impact van gegeven suboptimale condities te minimaliseren, of voorkomt erger.

*Wij denken dat het sanitaire condities model een gevalideerde werkwijze is. Uit de voorgaande studies zien we een variabele, maar aanzienlijke response van dieren op de sanitaire condities. Groei was bijvoorbeeld 6%, 10% en 22% hoger en eiwitvertering was 6, 1 en 7%-punt hoger voor varkens gehuisvest bij hoge sanitaire condities in de studie van Van der Meer et al. (2016), Van der Peet-Schwering et al. (2020; data van eerste 35 dagen) en Van der Meer et al. (2020), respectievelijk. Eén van de verschillen tussen deze studies was de mest die verspreid werd in de hokken. Zoals hierboven beschreven was het contrast in groei tussen sanitaire condities in de studie van Van der Meer et al. (2016) en Van der Peet-Schwering et al. (2020) kleiner dan het contrast in de studie van Van der Meer et al. (2020). Dit kan komen doordat in de eerste twee genoemde studies mest van slechts 1 bedrijf werd gebruikt om te verspreiden in de hokken van de varkens in de lage sanitaire condities. In de studie van Van der Meer et al. (2020) werd mest verzameld van 3 bedrijven, gepoold en verspreid in de hokken. Het creëren van een contrast met sanitaire condities is van groot belang voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. Daarom kiezen we ervoor om mest van verschillende bedrijven te screenen, en bij afwezigheid of lage aanwezigheid van bovenstaande pathogenen, te poolen en verspreiden, om een goed contrast te krijgen (terwijl de incidentie van klinische problemen/uitval niet groter wordt, afgeleid o.b.v. de eerder genoemde studies).
De aanpassingen in het project proposal en de bijlages zijn in blauw weergegeven.*

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 aangepaste aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het doel van dit project is om in varkens de effecten van een andere voersamenstelling als gevolg van kringlooplandbouw op verteringsprocessen en darmgezondheid te evalueren. Het onderzoek heeft vooral een praktische vraag: moeilijk verteerbaar eiwit worden in de dunne darm onvoldoende afgebroken en kunnen uiteindelijk in het milieu terecht komen. Daarnaast worden resten van (lokale) bijproducten of meer bewerkte bijproducten steeds vaker toegepast als onderdeel van de voeding. Deze resten hebben een hoger aandeel aan vezels of de inclusie van andere vezel-structuren en eiwit-structuren. De effecten van voer met dergelijke producten, met een hogere en andere soort vezel- en eiwit-fractie ten opzichte van gangbare voeringrediënten, op de vertering in de dunne darm zullen worden onderzocht in varkens met een verschillende hygiëne status.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en het welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan (bv. Wet Dieren en Wet Natuurbescherming).
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Directe doel : de opheldering van de rol van eiwit- en vezel fermentatie ten aanzien van darmgezondheid bij varkens.
Uiteindelijk doel : Bijdrage leveren aan de overall gezondheid en welzijn van het varken in het kader van de circulaire landbouw en de bijbehorende verandering van de ingrediënten samenstelling van varkensvoerders. Een

- efficiënt gebruik van voeder(bij)producten leidt tot een meer duurzame vleesproductie.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
De proefdieren ondervinden licht/matig ongerief; dit wordt gewaardeerd als een substantieel belang met hoge morele waarde.
De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang, het werk resulteert in publicaties, dit is van beperkte morele waarde.
Een voerfabrikant heeft mogelijk op termijn een reëel economisch belang van geringe morele waarde.
Voor de doeldieren (varkens) is er mogelijk op termijn een gezondheids-/welzijnsbelang waarvan de impact op dit moment niet goed is in te schatten.
Het gebruik van restproducten in een meer circulair gerichte industrie heeft een substantiële waarde van maatschappelijk belang.
De consument: wil graag vlees eten, beperkte morele waarde.
 6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IVD is de kennis en kunde voldoende gewaarborgd. Op basis van de opgegeven referenties lijkt de groep op de hoogte te zijn van soortgelijke activiteiten van andere onderzoek groepen.
8. Verteringsonderzoek en gezondheidsonderzoek in jonge biggen geeft informatie over de benutting van grondstoffen en de effecten van laagwaardig (eiwitarm/vezelrijk) voer op het dier. Het onderzoek naar de invloed van sanitaire omstandigheden zou ook in 2e instantie met een beperkt aantal voedercomponenten kunnen worden uitgevoerd. Nu streeft men ernaar om een verschil vast te stellen (door gebruik te maken van voer met hoog en laag eiwit), zouden bepaalde voederadditieven ervoor kunnen zorgen dat dit verschil meer maakt? Dit wordt eerst onder experimentele omstandigheden uitgevoerd.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: n.v.t.
10. Huisvesting wijkt volgens de onderzoekers af van de Annex III of the Directive 2010/63/EU. Dieren worden individueel gehuisvest gedurende 48 uur en op kale vloer. De huisvesting wijkt hiermee af van de eisen genoemd in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De onderzoeker heeft als argument dat de dieren anders het stro en het rubber opeet, wat een belangrijke invloed kan hebben op het onderzoek.
11. Het cumulatieve ongerief is ingeschat als mild hetgeen de Dec kan onderschrijven. De biggen krijgen geen bedding, maar wel ander spelmateriaal.
12. Naast ongerief door de solitaire huisvesting en de voor de proef noodzakelijke handelingen is er geen sprake van aantasting van integriteit.
13. Hoewel er HEP's zijn geformuleerd, zijn deze niet afhankelijk van de proef of veroorzaakt. Er zou diarree kunnen optreden (door de aanpassing van sanitaire omstandigheden) maar deze kunnen veterinaire behandeld worden en zullen geen aanleiding zijn voor een HEP. .

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. Dit type onderzoek kan alleen met het doeldier worden uitgevoerd.
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 aantal dieren wordt op basis van eerder onderzoek ingeschat. Tevens wordt een poweranalyse toegepast ter bepaling van het minimaal aantal benodigde dieren.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven.

17. Duplicatie van onderzoek: aangezien hier geen sprake is van wettelijk voorgeschreven onderzoek is deze vraag in dit geval niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen gebruikt worden in de proeven.
19. Een deel van de dieren worden gedood in het kader van het project volgens de methode in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. N.v.t.

NTS

21. 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: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effecten van moeilijk verteerbaar eiwit en vezelrijk voer afkomstig uit bijproducten van de kringlooplandbouw op de functie van de darm en de gezondheid van het dier het gering ongerief voor 260 varkens?
2. Het geringe nadeel voor de proefdieren weegt op tegen het belang van de overige belanghebbenden, zie ook C4 en C5.
3. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.
2. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de aanpak van de onderzoeker waarbij aan gezonde biggen mest in het verblijf wordt aangebracht afkomstig van bedrijven met verschillende hygiëne status. De IvD heeft daarover het volgende toegelicht: de IvD heeft ingestemd met het huidige voorstel (zoals beschreven in de proposal en de bijlagen) op basis van eerder behaalde resultaten. Zij is van mening dat deze aanpak interessante resultaten kan opleveren, omdat de techniek al eerder met succes is toegepast. De DEC leden hebben daar een onderling een verschillend standpunt in, hetgeen door hen vanuit verschillende expertise wordt ingebracht in de discussie. Hoewel men het doel volledig kan onderschrijven is er geen unaniem oordeel onder de DEC-leden over het gebruik van mest bij gezonde varkens om verschillende sanitaire toestanden na te bootsen. Enerzijds lijkt met deze methode de kans op herhaald, gevalideerd onderzoek klein omdat de samenstelling van mest immers steeds wisselt. Anderzijds hebben de onderzoeker al veel ervaring met deze werkwijze en zijn de resultaten bruikbaar gebleken en ondervinden de proefdieren mild ongerief. Er zal met worden verzameld van bedrijven waarvan bekend is wat er speelt en wordt geen mest gehaald bij bedrijven met een zware klinische infectie. De onderzoeker heeft echter in de tweede vragenronde de aanpak en de haalbaarheid beter onderbouwt vind het merendeel van de leden. Een van de leden vindt het geen goede proefopzet, omdat het niet gestandaardiseerd kan worden uitgevoerd.

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University
1.3	Provide the title of the project.	Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs

2 Categories

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

Pig feeds traditionally contain large amounts of cereal grains complemented with soy (-by products). The latter originate to a large extent from South American countries, and both are competing directly with resources for human consumption, which could compromise the sustainability of these feeds. Hence, in the Netherlands, there is a change towards circular agriculture, as indicated in the vision of the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality [1], to improve sustainability of the agricultural sector. However, this shift towards circular agriculture asks for a shift in resources used for animal feeds; from highly digestible cereal grains and oilseeds(products), to food waste and agricultural by-products that do not compete with resources for human consumption or energy production. These products typically have a lower nutritional value due to their high fiber contents and poor protein digestibility. For instance, the (small intestinal) protein digestibility of soybean meal typically is 88%, whereas that of rapeseed meal (a by-product from rape oil for human consumption and biofuel) is only 73% and that of sunflower seed meal is 80% [2]. Products like rapeseed meal and sunflower seed meal are already used in pig feeds, but their abundance is expected to increase substantially, because of a decrease in the use of human-edible resources in pig feeds. In addition, the food industry is continuously searching for refined products with increased nutritional value for humans by modifying extraction and processing conditions, resulting in lower nutritional value of the by-products available for pig feeds. Hence, feeding these future protein sources (including even further processed by-products or novel protein sources such as cottonseed meal or algae) to pigs will likely lower the small intestinal protein digestibility, leading to a greater flow of protein into the hindgut. In the hindgut, these proteins are preferred substrates for saccharo-proteolytic bacteria (such as Clostridia, Proteus and *E. coli*) resulting in the proliferation of these bacteria, some of which are known pathogens. When these undigested proteins are fermented, metabolites such as branched-chain fatty acids, ammonia, phenolic and indolic compounds, hydrogen sulfide, biogenic amines and nitric oxide and N-nitroso compounds are produced. Although some of these protein fermentation metabolites, e.g. polyamines, are important for gut function in lower concentrations, many of these metabolites have potential damaging effects on gut function [3-7]. In this way, the use of poorly-digestible protein sources might therefore negatively affect gut health. This is especially of importance in young animals, where the microbial community is not yet fully established and the gut wall is still developing and not resilient yet. It is, therefore, of great importance to evaluate the effects of diets with poorly digestible proteins/fractions on the intestinal microbiota, intestinal function, and overall health of piglets and gain more understanding of the nutritional value of future pig feed resources.

The extent to which ingested proteins escape small intestinal digestion and are prone to microbial degradation depends on the environmental conditions under which the piglets are kept. For instance, it has been demonstrated that pigs kept under low sanitary conditions (resulting in pigs with a chronically activated immune system, but without clinical signs of illness) have a reduced protein digestibility compared with pigs kept under high sanitary conditions [8-9]. The exact underlying mechanisms are unknown, but this is likely mediated via the microbiota. Experimental differences in sanitary conditions also reflect differences in environmental conditions which are known to occur in pig husbandry. Although it is known that such sanitary conditions can affect protein digestibility, it is, however, unknown whether sanitary conditions interact with the effects of undigested proteins on intestinal function and health in piglets.

The first aspect to study in this project is, therefore, how protein fermentation and sanitary conditions affect intestinal function and health of piglets. It is hypothesized that both protein fermentation and low sanitary conditions negatively affect intestinal health, but that these two

factors combined have a greater negative impact on intestinal health. If this hypothesis is true, this means in practice that feeding diets with larger amounts of low digestible proteins provides a greater risk for gut health issues at farms/departments with a lower (sub-clinical) health status. The knowledge obtained in this study is, therefore, of importance towards farm-specific feed advice in practice.

It is important to note that the sanitary challenge model mimics variation as observed in practice, without inducing clinical problems. From previous studies using this model, we know that the low sanitary conditions lower protein digestion and growth, without inducing clinical infections [9,10]. The decrease in growth and feed efficiency with low sanitary conditions has been reviewed by Pastorelli et al. (2012) and are in a similar range as found in practice. So with this model, we can induce a contrast in a sub-clinical range, which results in differences as seen in practice. In this way, we can study the effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal health, and study the underlying mechanisms.

Apart from the reduction in protein digestibility and the presumable negative effects on intestinal function and health, the shift towards increased use of fiber-rich feed resources will inevitably also lead to increased inclusion levels of fibers and different protein fractions. It is known that fibers may interfere with various digestive process, such as nutrient accessibility, bulking properties, microbial activity, gut physiology and function, endogenous secretions, and flow of digesta through the gastro-intestinal tract, thereby affecting nutrient digestion and gut health. Interestingly, such fiber-structures could have the potential to steer protein fermentation and thereby alleviate potential negative effects on gut health. Problematically, the exact effect of the various fiber and protein structures found in unconventional or further processed feed resources are not well defined, hampering the prediction of the nutritional value of such diets. Accurate prediction of small intestinal digestion and fermentation and the effect on the intestinal wall of these unconventional feed resources is paramount for designing (young) pig feeds based on high concentrations of high-fiber high-protein by-products that maximize the conversion of these resources into edible products while minimizing the negative impact on gut health.

The second aspect addressed in this project is, therefore, how fiber and protein fractions (separately or combined) from agricultural by-products affect digestive processes as digesta transit, nutrient digestibility, and microbial colonization. It is hypothesized that both fiber and protein fractions affect digestive processes, and that interactions effects occur.

In this project, the overall objectives are to evaluate the effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal function and health of piglets and how fiber-and protein level and structure from agricultural by-products affect digestive processes in pigs. With this basic and applied knowledge, (dietary) strategies could be designed to accommodate the shift in feed resources while maintaining adequate intestinal function and health of piglets, when moving into an era of circular agriculture.

References

1. Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. 2018. Landbouw, natuur en voedsel: waardevol en verbonden. Nederland als koploper in kringlooplandbouw. www.rijksoverheid.nl/ministeries/ministerie-van-landbouw-natuur-en-voedselkwaliteit/documenten/beleidsnota-s/2018/09/08/visie-landbouw-natuur-en-voedsel-waardevol-en-verbonden.
2. CVB Veevoedertabel 2018. Chemische samenstellingen en nutritionele waarden van voedermiddelen. www.cvbdiervoeding.nl

3. Lin HC, Visek WJ. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *J Nutr.* 1991;121:887-93.

4. Hughes R, Kurth MJ, McGilligan V, McGlynn H, Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. *Nutr Cancer.* 2008;60:259-66.

5. Andriamihaja M, Lan A, Beaumont M, Audebert M, Wong X, Yamada K, Yin Y, Tomé D, Carrasco-Pozo C, et al. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2015;85:219-27.

6. Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, Khodorova N, Audebert M, Blouin J, Grauso M, Lancha L, Benetti P, et al. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. *Free Radic Biol Med.* 2016;93:155-64.

7. Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottière HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso M, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, et al. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1725:201-12.

8. Kampman-van der Hoek E, Jansman AJM, van den Borne JJGC, van der Peet-Schwering CMC, van Beers-Scheurs H, Gerrits WJJ. Dietary Amino Acid Deficiency Reduces the Utilization of Amino Acids for Growth in Growing Pigs after a Period of Poor Health. *J Nutr.* 2016;146:51-58.

9. van der Meer Y, Lammers A, Jansman AJM, Rijnen MMJA, Hendriks WH, Gerrits WJJ. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. *J Anim Sci.* 2016;94:4704-4719.

10. van der Meer Y, Jansman AJM, Gerrits WJJ. Low sanitary conditions increase energy expenditure for maintenance and decrease incremental protein efficiency in growing pigs. *Animal* (2020) 1-10. doi:10.1017/S1751731120000403

11. Pastorelli H, van Milgen J, Lovatto P, Montagne L. Meta-analysis of feed intake and growth responses of growing pigs after a sanitary challenge. *Animal* (2012), 6:6, 952-961.

3.2 Purpose

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

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

The main objectives of this project are to evaluate the effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal function and health of piglets and how fiber- and protein level and structure from agricultural by-products affect digestive processes in pigs.

We aim to reach this objective through a series of piglet studies, described in 3.4.

The specific key research questions to be studied are:

1. How does protein fermentation affect intestinal function and health of piglets, and is this effect dependent on sanitary conditions?
2. How do fiber and protein fractions from agricultural by-products affect digestive processes as digesta transit, nutrient digestibility, and microbial colonization, and do these fiber- and protein fractions have interacting effects?

We expect to reach our main project's objective, because the scientific partners have extensive expertise in the research areas (i.e. animal nutrition, microbiology, host physiology/metabolism, metabolomics tools) required within this project. In addition, we collaborate with an industrial partner, who is a global leader in additives for animal feed and serves animal feed producers worldwide with products and formulation services, and is a direct stakeholder for the utilization of newly gained knowledge.

3.3 Relevance

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

In the Netherlands, there is a focus to change towards circular agriculture, as indicated in the vision of the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality. An increased use of regional resources and (highly-processed) by-products is aimed for. This results in changes in the diets of production animals. This project will provide insight into digestive processes of such diets and how they affect intestinal function and health of piglets and how this is influenced by environmental conditions. With this knowledge, (dietary) strategies could be designed to accommodate the shift in feed resources while maintaining adequate intestinal function and health of pigs, when moving into an era of circular agriculture.

3.4 Research Strategy

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

The overall design of the project is illustrated in figure 1.

The diets of pigs are expected to change within a circular agricultural system. Diets for piglets in the future are expected to have a poorer protein digestibility, which will increase the flow of protein into the hindgut of piglets. The effects of the resulting increase in protein fermentation on the microbiota composition, intestinal wall, and health of the piglets - depending on sanitary conditions the piglets are exposed to (as described in paragraph 3.1) - are evaluated in appendix 1.

In addition to poor protein digestibility, the shift towards increased use of fiber-rich feed resources will inevitably also lead to increased inclusion levels of fibers and different protein fractions. The (interacting) effects of fiber and protein structures found in unconventional feed resources on digestive processes, such as digesta transit, nutrient digestibility and microbial colonization are evaluated in appendix 2.

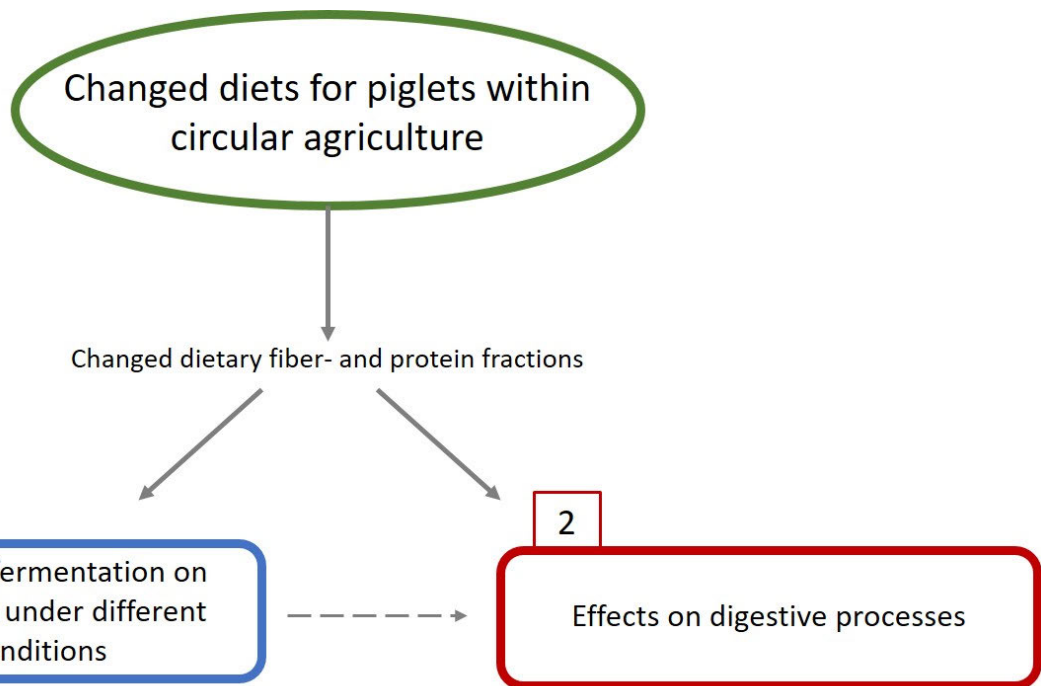


Figure 1. Overall design of the project. The diets of pigs are expected to change within a circular agricultural system (green box), resulting in changes in fiber- and protein fractions. The proteins are expected to have a poorer digestibility, resulting in protein fermentation. The effects of protein fermentation and the potential interaction with sanitary conditions is evaluated in appendix 1 (blue box). Effects of changed dietary fiber- and protein fractions on digestive processes will be evaluated in appendix 2 (red box). Intestinal tissue samples are collected in appendix 2, and based on the outcome of appendix 1 (i.e. if protein fermentation is found to affect intestinal function), intestinal function is evaluated in appendix 2 as well (grey dashed arrow). In addition, the potential effects of protein fermentation and sanitary conditions on intestinal function are likely mediated via the microbiome. Fiber- and protein fractions can steer the microbiome, and with that digestive processes.

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.

Two appendices are included in this project to answer the research questions as described in paragraph 3.2.

Appendix 1: Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions

This experiment is designed in a 2 x 2 factorial arrangement with diet (high or low protein fermentation) and sanitary conditions as factors. To evaluate effects on microbiota composition and protein fermentation products, feces will be collected daily. To evaluate effects on intestinal function, ileal digestibility and digesta protein fermentation products, a sub-set of piglets is dissected for the collection of intestinal tissues and digesta samples. Overall performance is evaluated by measuring body weight gain and feed intake, and by registering daily clinical health.

Appendix 2: Digestibility experiment with young pigs

In this type of animal procedure, pigs are fed with diets differing in fiber and protein fractions, as expected within circular agriculture systems and effects on digestive processes, such as digesta transit, nutrient digestibility, and microbial colonization are evaluated. Pigs are fed these diets and fecal samples are collected for evaluating total tract digestion. Subsequently, pigs are housed

individually and frequently fed to obtain steady-state conditions in the gastro-intestinal tract. Thereafter, pigs are dissected for the collection of digesta and tissue samples along the gastro-intestinal tract to determine ileal nutrient digestibility and passage kinetics.

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

The experiments described in the appendices all relate to the effects of changed dietary composition (related to circular agriculture) and are conducted in parallel.

The effects of a poorer protein digestion and the (interacting) effect of sanitary conditions on intestinal function and health in piglets are evaluated in appendix 1. This basic knowledge will increase our understanding of how an increased use of feed resources with a poorer protein digestibility will affect intestinal function in piglets.

The effects of diets with a changed composition on digestive processes are evaluated in appendix 2 and will increase our understanding and prediction of small intestinal digestion and fermentation of unconventional feed resources which is required for designing future pig feeds.

Intestinal tissue samples upon dissection will be collected in appendix 2 (depending on dietary contrast). An important selection step is to decide to evaluate the potential effects of diets in appendix 2 on intestinal function. This depends on the results obtained in appendix 1. If protein fermentation indeed affects intestinal function as evaluated in appendix 1, then it is of importance to include measurements on intestinal function in appendix 2 as well.

Milestones include knowledge on how protein fermentation and environmental conditions relate to intestinal function and health of piglets and quantitative digestibility and passage behavior data of novel/changed diets for pigs.

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	Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions
2	Digestibility experiment with young pigs

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400					
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University					
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="443 1021 619 1059">Serial number</th> <th data-bbox="935 1021 1431 1059">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="443 1059 619 1288">1</td> <td data-bbox="935 1059 1431 1288">Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions	
Serial number	Type of animal procedure						
1	Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions						

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 objective is to determine how protein fermentation and sanitary conditions affect intestinal function and health of piglets.

The experiment is designed as a 2 x 2 factorial arrangement. Factors are diet (inducing more or less protein fermentation, for instance by using protein sources differing in digestibility, using different protein inclusion levels or applying heat treatment a protein source to reduce protein digestibility) and sanitary conditions (reflecting differences in microbial pressure as found in practice) as factors. Low sanitary conditions are created by spreading feces or manure from commercial pig farms in the pens.

Piglets (n = 40 per treatment) arrive at the facilities at weaning and the experiment will last 2 weeks. The experiment will be performed over multiple batches in the climate-controlled respiration chambers. Housing in the climate-controlled respiration chambers is desired for strict separation of the sanitary conditions per unit. In addition, this allows measurements of energy metabolism. Feces will be collected daily, to evaluate effects of treatments on microbial composition, protein fermentation metabolites and markers of gut health (e.g. calprotectin). To evaluate effects on intestinal function a sub-sample of the piglets (n = 20 per treatment) will be dissected for intestinal tissue collection. The dissection of the sub-sample of piglets is timed when the largest effects on intestinal function are expected (e.g. at day 7 after arrival). The piglets that are not dissected, will remain in the climate-controlled respiration chambers until day 14 to evaluate effects on the microbiota and overall health and performance of piglets.

Primary output parameters include ileal and total tract nutrient digestibility, fecal and digesta protein fermentation metabolites and microbial composition, parameters of intestinal function (intestinal morphology, intestinal barrier function, fecal calprotectin), stress markers (salivary cortisol), and energy metabolism and performance (body weight gain, feed intake, feed efficiency). In addition to feed intake at pen level, individual feed intake will be estimated using video recordings and a dual marker technique at two time points in the experiment. Individual feed intake will – together with the digestibility of the proteins – determine the flow of protein into the hindgut and can, therefore, contribute to the effects on intestinal function and health. With the dual marker technique, piglets will be dosed with a reference marker (in a feed pellet) 3 times daily for 2 days and fecal spot samples are collected twice on one day (i.e. 1 time period). Another marker will be included in the feed (to which piglets have ad libitum access), and the ratio between the reference marker and the feed marker in the feces can be used to calculate feed intake. Piglets will be administered with the pellet with reference marker by hand and are trained for 2 days before the measurement starts to eat this pellet by hand feeding.

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

The sanitary challenge (low sanitary conditions, LSC) is applied to 2 treatment groups (n = 80 piglets). The sanitary challenge will be similar to van der Meer et al. (2016 & 2020). Feces or manure from commercial pig farms (without clinical problems) will be regularly spread in the pens of LSC piglets. HSC piglets will be housed in thoroughly cleaned and disinfected pens. We have successfully created a contrast in sanitary conditions before in three pig studies (van der Meer et al., 2016 & 2020, and van der Peet-Schwering et al., 2020) and in one broiler study (Holleman et al., unpublished). This contrast in sanitary conditions resulted in differences in sub-clinical health, but not in clinical health problems. To further reduce the risk of clinical infections, (toxins of) pathogens associated with diarrhea or lung problems [*Escherichia coli* (ETEC), *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Lawsonia intracellularis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus] will be screened for in the feces to be spread in the pens in the low sanitary conditions treatment. Batches of feces with a high abundance of (toxins of) pathogens will be discarded and not spread in the pens.

In order to evaluate the effects of diet and sanitary conditions on nutrient digestibility, intestinal function and health, the following measurements are included:

For 80 piglets:

- Daily rectal fecal collection (7 days)
- Saliva collection (7 days)
- Body weight (2 times)
- Feeding marker (3x for 2 days) and collecting rectal fecal sample twice a day (1x)
- Dissection (once)

For 80 piglets:

- Daily rectal fecal collection (14 days)
- Saliva collection (14 days)
- Body weight (3 times)
- Feeding marker (3x for 4 days) and collecting rectal fecal sample twice a day (2x)

To obtain rectal fecal samples, piglets are handled/picked-up. If a piglet does not defecate during handling, the fecal sample is collected via manual stimulation, by carefully entering the anus and gently stimulating the rectal ceiling (max. of 2 minutes) to stimulate defecation. A maximum of 3 attempts is used per piglet in order to obtain the rectal fecal sample.

Saliva is collected by taking a swab from the oral cavity of the piglets. Collection of saliva and feces will be combined as much as possible to minimize handling of the piglets.

Piglets will be euthanized in order to collect intestinal wall and digesta samples. Laboratory analyses will be conducted in the obtained samples to determine the effects of the treatments.

Reference

van der Meer, Lammers, Jansman, Rijnen, Hendriks, and Gerrits. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. *J Anim Sci* (2016) 94:4704-4719.

van der Meer, Jansman, Gerrits. Low sanitary conditions increase energy expenditure for maintenance and decrease incremental protein efficiency in growing pigs. *Animal* (2020) 1-10. doi:10.1017/S1751731120000403

van der Peet-Schwering, Verheijen, Binnendijk, Jansman. Amino acid and energy requirements of growing-finishing pigs kept under low and high sanitary conditions. Wageningen Livestock Research, Report 1248.

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

Power analyses have been used to estimate the minimal number of piglets required to detect differences in intestinal and microbiota parameters, which are important read-out parameters in this experiment. For instance, using crypt depth in the distal colon of piglets with and without intestinal problems (Gilbert et al., 2019) in a power analysis, the minimum number of piglets per treatment is 17 to obtain a power of 0.819. Using fecal concentration of ammonia (a product produced when protein is fermented; Gilbert et al., 2019) results in a requirement of 34 piglets per treatment to obtain a power of 0.8. To detect differences between treatments in fecal microbiota composition in weaned piglets, we expect to require 40 piglets per treatment, based on experience and a previous experiment (van der Hee et al., unpublished). Therefore, we will use 40 piglets per treatment in total, of which 20 piglets will be used for measurements of intestinal function and ileal digestibility following dissection.

Reference

Gilbert, M. S., B. van der Hee, and W. J. J. Gerrits. 2019. The role of protein fermentation metabolites in post-weaning diarrhoea in piglets. Pages 361 - 362 in 6th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Belo Horizonte, Brazil. M. L. Chizzotti, ed. Wageningen Academic Publishers.

B. The animals

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

Piglets will be used in this experiment, because this is the target animal. This experiment is aimed at evaluating the (interacting) effects of diet and sanitary conditions on intestinal function and health, and no appropriate non-animal model is available.

Piglets (n = 160), divided over multiple batches, will be collected from a commercial pig farm at weaning, transported to the experimental facilities and remain at the experimental facilities for 2 weeks. The objective of this study is to evaluate (interacting) effects on intestinal function, which is expected to be highest at 7 days after weaning. For instance, intestinal villi length was affected by a pathogen challenge in piglets at day 7 after weaning, but not a day 14 (Heo et al., 2010). However, for microbial composition, protein fermentation and post-weaning performance, 14 days are taken into account. For instance, rectal ammonia and short-chain fatty acids (fermentation products) concentrations were higher at day 14 than at day 7 after weaning (Heo et al., 2010).

Reference

Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2010. Feeding a diet with a decreased protein content reduces both nitrogen content in the gastrointestinal tract and post-weaning diarrhoea, but does not affect apparent nitrogen digestibility in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 160:148-159.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: piglets are the target animal. This experiment is aimed at evaluating the (interacting) effects of diet and sanitary conditions on microbiota composition, intestinal function and health, and no appropriate non-animal model is available due to the complex interaction between these parameters in vivo.

Reduction: the number of animals is based on power analyses and previous studies focused on intestinal parameters.

Refinement: piglets will be group-housed and receive toys as environmental enrichment. Killing of the piglets will be performed by skilled personnel to minimize stress.

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

All animal handling procedures will be conducted by experienced staff (feeding, weighing, transport). Various, non-destructible toys will be made available to the pigs as environmental enrichment, and toys will be alternated regularly.

Nutrient digestion, microbial composition, and protein fermentation are primary output parameters in this study. Therefore, antimicrobial treatments should be withheld, because these will affect microbial composition and microbial metabolite production and their potential effect on intestinal function and health. In case of severe clinical sickness, there will be discussion between researchers, animal caretakers, and a veterinarian to determine if measures are required. In that case, a piglet can be treated (and removed from the experiment) or euthanized.

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.

To the best of our knowledge, the interactive effects of dietary protein and sanitary conditions on intestinal function and health have not been studied previously. If newly published papers indicate novel insights in the topic that have not been taken into account but are of relevance for the proposed experimental design, experimental procedures will be reconsidered.

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 piglets are checked daily by a qualified person and sick piglets will be noted (for instance diarrhea). However, piglets cannot be treated with antibiotic treatment, because this will interfere with the primary output parameters.

The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs (in an unknown quantity) and can interfere with the dietary treatments and output parameters (nutrient digestion, microbiota, protein fermentation). Pigs will receive toys as enrichment.

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.

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

Piglets that will be dissected will be sedated prior to anesthesia / euthanasia. Sedation will be via i.m. injection, and piglets can experience minor and short-term pain from i.m. sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

A previous study using similar contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2016 & 2020) did induce differences in subclinical health status. In those studies, no adverse effects of the low sanitary status on animal welfare were found. [In those studies, the feces spread in the low sanitary conditions pens were not screened beforehand on the \(high\) presence of pathogens. We will screen for \(toxins of\) pathogens \(see A2\) and exclude the use of feces with a high abundance of a pathogen. This minimizes the risk for infection and subsequent clinical problems such as diarrhea.](#) Diarrhea can occur due to the feeding of a diet with a lower protein digestibility. No antimicrobial treatments should be provided, because these will interfere with the main measurements. This might result in a higher incidence or severity of clinical sickness (e.g. diarrhea).

Reference

van der Meer, Lammers, Jansman, Rijnen, Hendriks, and Gerrits. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. *J Anim Sci* (2016) 94:4704-4719.

[van der Meer, Jansman, Gerrits. Low sanitary conditions increase energy expenditure for maintenance and decrease incremental protein efficiency in growing pigs. *Animal* \(2020\) 1-10. doi:10.1017/S1751731120000403](#)

Explain why these effects may emerge.

The potential adverse effects can occur due to the experimental treatments and by withholding antimicrobial treatments which are required aspects of this experimental design.

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

Antimicrobial treatments cannot be applied because these treatments will interfere with the measurements. [We will screen the feces on \(toxins of\) pathogens and exclude the spreading of feces with a high abundance of a pathogen \(see A2 and I1\).](#) Furthermore, piglets will be inspected daily. In case of clinical signs of sickness, there will be discussion between researchers, animal caretakers and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. In that case, a piglet can be treated (and removed from the experiment) or euthanized.

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.

Based on a similar sanitary conditions model (van der Meer et al., 2016 & 2020), the procedures are not likely to require humane endpoints. In case of sick piglets, there will be discussion between researchers, the animal caretaker and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. For instance, piglets can be treated with painkillers when required. Furthermore, when antibiotic treatment is required in the expert opinion of a veterinarian, the piglet is removed from the trial.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of humane endpoints is estimated at <5%.

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 cumulative discomfort in this experiment is estimated to be mild.

- No bedding (mild)
- Risk of diarrhea related to experimental treatments (mild)
- Rectal fecal sampling (mild)
- Saliva sampling (mild)
- Sedation previous to dissection (mild)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

A sub-sample of piglets will be killed in order to collect the required 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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Digestibility experiment with young 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.

Diets for pigs are expected to change within a circular agriculture system. Increasing use of regional (fiber-rich) agricultural by-products or even further processed by-products will alter the dietary composition, with unknown effects on various digestive process, such as digesta transit, microbial colonization, and nutrient digestibility; and with that nutrient and energy availability for the pig. Therefore, the overall objective is to evaluate the digestibility and digesta passage kinetics of such diets.

Diets, based on various **commercially-available** agricultural by-products (such as oilseed meals and cereal by-products from the milling industry) are used in digestibility studies. Pigs will be fed the diets for four weeks after which the digesta passage kinetics and ileal digestibility will be measured following dissection. Primary output parameters are ileal and total tract nutrient digestion, digesta passage kinetics, and performance (body weight gain, feed intake, efficiency).

Considerable research is being conducted worldwide regarding nutrient digestion of feed ingredients. In this appendix, in addition to digestibility measurements, we include measurements on digesta passage kinetics and fermentation characteristics as well, which are often not evaluated in general digestion trials. Digesta passage kinetics are of importance for accurate prediction of the nutritional value of diets within a circular agriculture and to evaluate the potential effect on (gut) health in a response to an overflow of nutrients into the large intestine. Therefore, intestinal tissue samples are collected upon dissection as well, to evaluate potential effects on intestinal function, if deemed of importance based on the results from appendix 1.

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

In order to determine total tract nutrient digestibility, rectal fecal samples are collected multiple times per pig (6 times at max) following feeding of an indigestible marker in the feed. For evaluating performance, body weight of pigs is determined 5 times. To determine ileal digestibility and passage along the gastro-intestinal tract, pigs are dissected for the collection in digesta samples, following feeding of indigestible markers. In order to obtain a steady-state in the gastrointestinal tract, pigs will be frequently fed (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). At maximum 48h before dissection, pigs will be housed individually and will be adapted to frequent feeding.

To obtain rectal fecal samples, pigs are handled/fixated. If a pig does not defecate during handling, the fecal sample is collected via manual stimulation, by carefully entering the anus and gently stimulates the rectal ceiling (max. of 2 minutes) to stimulate defecation. A maximum of 3 attempts is used per pig per sampling moment in order to obtain the rectal fecal sample.

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

The number of pigs required per dietary treatment is based on previous digestibility studies. For determining total tract and ileal digestibility of nutrients, 8 piglets per treatment were required (Bikker et al., 2006; Heo et al., 2008). Our experience with using more fiber-rich by-products is that the variation in digestibility is higher, and, therefore, 10 pigs per treatment are estimated to be required. Overall, we estimate to evaluate 10 dietary compositions, which results in a total of 100 pigs.

References

Bikker, P., A. Dirkzwager, J. Fledderus, P. Trevisi, I. le Huërou-Luron, J. P. Lallés, and A. Awati. 2006. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 84:3337-3345.
Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2008. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. *Arch. Anim. Nutr.* 62(5):343-358.

B. The animals

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

In total, 100 young pigs will be used to evaluate nutrient digestibility and digesta passage kinetics. Pigs will be obtained from a commercial pig farm and the experimental procedures will last 5 weeks at max. Pigs are used in this experiment, because this is the target animal. Although digestibility can be estimated using *in-vitro* techniques, the complex interactions between ingredients, the microbiota and passage cannot be determined with *in-vitro* techniques. Therefore, this will be tested using *in-vivo* experiments.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: pigs are the target animal. Although digestibility can be estimated using *in-vitro* techniques, the complex interactions between ingredients, the microbiota, and digesta passage cannot be determined with *in vitro* techniques. Therefore, this will be tested using *in-vivo* experiments.

Reduction: the number of animals is estimated from previous digestibility studies.

Refinement: pigs will be group-housed for the major part of the study and the duration of individual housing is limited to a maximum of 48h to minimize discomfort. During individual housing, pigs will be able to see and hear each other, have snout contact and will receive toys as enrichment. Killing of the pigs will be performed by skilled personnel to minimize stress.

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

All animal handling will be performed by skilled staff. Various, non-destructible toys will be available to the pigs as environmental enrichment, both during group- and individual housing, and will be alternated regularly. No exceptional adverse effects of this experiment on the environment are expected.

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.

Transition towards circular agriculture is an on-going topic, with new (nutritional) challenges occurring regularly. Digestibility and digesta passage kinetics within such novel diets are not well defined. Before conducting a digestibility study, a new literature search will be performed and experimental treatments or procedures will be reconsidered in case of novel insights from newly published papers.

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.
-

Housing and care is according to Annex III, except, when pigs are housed individually in pens (48h at max). Individual housing is needed to make sure that every animal consumes feed at each time point a meal is given (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. The pigs will be housed on partially-slatted floor pens with rubber mats. The floor area of the pens in which pigs will be individually housed, will be min. 2 m², allowing the pigs to move around freely. Bedding material is not provided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Rubber mats will be removed 3 days before individual housing, because pigs consume pieces of rubber mat as well (as occurred during a previous pig experiment). During individual housing, pigs will be able to see and hear each other and have snout contact. Animals will receive toys as enrichment.

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.

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

Pigs will be dissected, and will be sedated prior to anesthesia / euthanasia. Sedation will be via i.m. injection, and pigs can experience minor and short-term pain from this i.m. injection.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The dietary treatments might result in an increased passage or fermentation in the intestinal tract, leading to intestinal problems, such as diarrhea.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge as part of the dietary treatments

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

In case of diarrhea related to dietary treatment, feed supply can be reduced to minimise these adverse effects.

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.

Circumstances requiring humane endpoints are not expected as a result of the animal procedures. Clinical illness unrelated to the dietary treatments, as observed in general in pig husbandry, can occur. In case of sick pigs, there will be discussion between researchers, the animal caretaker and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of humane endpoints is estimated to be below 5%.

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 level of discomfort is estimated at mild, based on individual housing with snout contact (48h), rectal fecal sampling, no bedding material, risk of diarrhea related to experimental treatments and sedation prior to dissection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Pigs will be killed and dissected, which is necessary to obtain samples for digestibility and passage measurements.

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

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Het evalueren van dieeteffecten op darmgezondheid in varkens
1.2	Looptijd van het project	1-9-2020-1-9-2025
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Dieet, darmgezondheid, darmfunctie, vertering, varkens

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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

3 Projectbeschrijving

<p>3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)</p>	<p>In Nederland is een transitie richting kringlooplandbouw gaande, om de impact van de landbouw op het milieu en de natuur te verlagen. Een van de manieren om aan kringlooplandbouw bij te dragen is om grondstoffen en bijproducten uit de akkerbouw, tuinbouw en veehouderij in een zo regionaal mogelijke keten te gebruiken. Dit heeft gevolgen voor de samenstelling van de voeding voor landbouwhuisdieren, waaronder varkens.</p> <p>Eén gevolg zal verandering in de eiwitcomponent van het voer zijn. Eiwit is een belangrijke component, omdat het de bouwstenen levert voor groei. De eiwitbronnen beschikbaar in de kringlooplandbouw worden minder goed verteerd in de dunne darm van biggen. Wanneer voereiwit niet volledig wordt verteerd in de dunne darm, komt dit in de dikke darm terecht, waar het eiwit door bacteriën wordt afgebroken. Dit heeft mogelijk negatieve effecten op darmfunctie en gezondheid van biggen. Deze effecten zijn waarschijnlijk afhankelijk van de omgevingsomstandigheden waarin de varkens gehuisvest zijn, omdat deze omstandigheden een effect hebben op de bacteriën in de darm van de varkens. Daarom zullen de effecten van eiwitfermentatie en omgevingsomstandigheden op darmfunctie en gezondheid bepaald worden.</p> <p>Een tweede gevolg voor de voeding van varkens met het gebruik van nieuwe (lokale) bijproducten of meer bewerkte bijproducten is een hoger aandeel aan vezels of de inclusie van andere vezel-structuren en eiwit-structuren. De effecten van voer met dergelijke producten, met een hogere en andere soort vezel- en eiwit-fractie ten opzichte van gangbare voeringrediënten, op de vertering in de dunne darm zullen in kaart gebracht worden.</p> <p>Het doel van dit project is om in varkens de effecten van een andere voersamenstelling als gevolg van kringlooplandbouw op verteringsprocessen en darmgezondheid te evalueren.</p>
<p>3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p>	<p>In dit project zal kennis verkregen worden over verteringsprocessen en darmgezondheid in varkens in relatie tot voeders in de kringlooplandbouw. Deze kennis is nodig om (voer)strategieën te ontwikkelen binnen de voedingsuitdagingen die de kringlooplandbouw met zich meebrengt.</p>
<p>3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p>	<p>In dit project worden in totaal 260 varkens gebruikt.</p>
<p>3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p>	<p>In dit project zullen varkens gevoerd worden met voeders met verschillende samenstelling, soms onder variërende omgevingsomstandigheden. Vervolgens worden monsters verzameld om de effecten hiervan te bepalen. Dieren zullen ongerief ondervinden als gevolg van hanteren (voor het wegen van dieren en verzamelen van speeksel), het nemen van rectale mestmonsters en het verdoven voor het doden van de dieren voor het eenmalig verzamelen van darminhoud en darmwand. Daarnaast zal ongerief gepaard gaan met tijdelijke (48 uur) individuele huisvesting.</p>

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het ongerief wordt ingeschat als licht.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Waar mogelijk zullen de dieren de voedselketen ingaan. De dieren die worden geëuthanaseerd voor het verzamelen van darmmonsters zullen naar de destructie gaan.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	In dit project is het varken het doeldier. De interacties tussen voeding, enzymen en bacteriën in de darm, de darmwand en het dier zijn erg complex en kunnen niet bepaald worden met een proefdiervrij model.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Voor elk experiment is het minimale aantal dieren bepaald dat nodig is om een betrouwbaar antwoord te krijgen op de onderzoeksvraag. Hiervoor is gebruik gemaakt van informatie uit de literatuur.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	In dit project is het varken het doeldier en de interacties tussen voeding, enzymen en bacteriën in de darm, de darmwand en het dier zijn erg complex en kunnen niet bepaald worden met een proefdiervrij model. Verfijning wordt toegepast door varkens zoveel mogelijk in groepen te huisvesten, afleidingsmateriaal in de (groeps- en individuele) hokken te verstrekken en door te zorgen dat varkens elkaar kunnen zien, horen, ruiken en neuscontact kunnen hebben tijdens individuele huisvesting.

4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

- Tijdens de experimenten zullen de dieren dagelijks gecontroleerd worden door gediplomeerde en bekwame dierverzorgers.
- In geval van ziekte of ongerief anders dan voorzien is in het proefplan, zal een dierenarts worden geraadpleegd en na overleg bepaald worden of een dier moet worden behandeld of uit de proef gehaald moet worden.
- Het hanteren van dieren, het verzamelen van mestmonsters en het verdoven en euthanaseren van dieren wordt gedaan door bekwaam personeel om zo weinig mogelijk stress te veroorzaken.
- Varkens krijgen afleidingsmateriaal in de hokken en dit wordt regelmatig vervangen, zowel bij groeps- als bij individuele huisvesting.
- Tijdens individuele huisvesting kunnen varkens elkaar zien, horen, ruiken en neuscontact hebben.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling
achteraf



Advies aan CCD

Datum 03 juli 2020
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209705

Instelling: Wageningen University & Research
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs
 Aanvraagnummer: AVD20209705
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	geen bijzonderheden			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		160	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		100	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn



Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions

Varkens (Sus scrofa domesticus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs

Varkens (Sus scrofa domesticus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD_5.1 lid2e.pdf

Pagina: 1

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 3-7-2020 12:15:20
CITATEN Afwijkende huisvesting/verzorging (zou ik nog ergens invoegen)

"The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs (in an unknown quantity) and can interfere with the dietary treatments and output parameters (nutrient digestion, microbiota, protein fermentation). Pigs will receive toys as enrichment."

"In order to obtain a steady-state in the gastrointestinal tract, pigs will be frequently fed (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). At maximum 48h before dissection, pigs will be housed individually and will be adapted to frequent feeding."

"The experiment will be performed over multiple batches in the climate-controlled respiration chambers. Housing in the climate-controlled respiration chambers is desired for strict separation of the sanitary conditions per unit"

"Housing and care is according to Annex III, except, when pigs are housed individually in pens (48h at max). Individual housing is needed to make sure that every animal consumes feed at each time point a meal is given (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. The pigs will be housed on partially-slatted floor pens with rubber mats. The floor area of the pens in which pigs will be individually housed, will be min. 2 m², allowing the pigs to move around freely. Bedding material is not provided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Rubber mats will be removed 3 days before individual housing, because pigs consume pieces of rubber mat as well (as occurred during a previous pig experiment). During individual housing, pigs will be able to see and hear each other and have snout contact. Animals will receive toys as enrichment."

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Vraag DEC: De DEC heeft twijfels over de herhaalbaarheid, nawerkbaarheid en toetsbaarheid van het eerste deel van dit project. De sanitaire interventie door mest binnen te halen van andere bedrijven brengt verschillende risico's met zich mee. In de mest kunnen ziektekiemen zitten die het verloop van de proef beïnvloeden. Omdat de samenstelling van mest varieert tussen bedrijven en in de tijd is de vraag gerechtvaardigd hoe representatief en relevant de steekproef is en hoe een experiment herhaald kan worden onder dezelfde condities. Gezien deze opmerkingen vraagt de DEC zich af of onderzoekers niet beter met de experimenten uit bijlage 2 kunnen starten, gevolgd door een veldstudie op bedrijven met verschillende hygiënestatus. Indien u blijft bij uw voornemen de experimenten uit bijlage 1 uit te voeren zoals beschreven in bijlage 1, wat is dan de translatie van de verkregen gegevens naar de praktijk?</p> <p>Reactie aanvrager:Het vooraf inschatten van de gezondheidsstatus van een bedrijf biedt dus geen garantie op een contrast in gezondheidsstatus in de periode van meten, tussen de studie-individuen. Wij denken dat het opleggen van een experimenteel contrast in sanitaire condities daarom geschikter is om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.</p> <p>Naar aanleiding van de resultaten uit deze veldstudie zijn wij begonnen met het bestuderen van effecten van chronische, milde activering van het immuunsysteem met sanitaire condities, een variant op eerder gepubliceerd onderzoek bij INRA (zie review Pastorelli et al., 2012) en in de USA (Williams et al., 1997). De samenstelling van mest kan inderdaad variëren tussen bedrijven en over tijd, maar met de sanitaire interventie kunnen we een gecontroleerd, praktisch relevant contrast aanbrengen. Inmiddels hebben we in verschillende projecten 4 experimenten gedaan met een contrast in sanitaire condities (1 studie met vleeskuikens, Hollemans et al., unpublished en 3 studies met varkens, van der Meer et al., 2016 en 2020, en van der Peet-Schwering et al., unpublished). De resultaten uit de niet gepubliceerde studies zijn desgevraagd beschikbaar. In alle 4 de studies is het gelukt om een voldoende groot contrast te creëren met deze interventie. Daarnaast leidde het contrast tot verschillen in subklinische gezondheid en NIET tot klinische problemen. Dit maakt deze benadering interessant, vertaalbaar naar de praktijk, maar ook een goed wetenschappelijk model voor de impact van milde, chronische activering van het immuunsysteem. Uiteraard kan het voorkomen dat er ziektekiemen in de mest aanwezig zijn en we</p>
-------------------	--

realiseren ons dat dit een risico kan zijn en monitoren de klinische gezondheid daarom goed. Daarnaast is het door deze variatie juist van belang om de studie over meerdere batches uit te voeren. Dit betekent dat we de mogelijke verschillen/variatie in de response op de sanitaire interventie kunnen bestuderen. Hiermee maken we dus binnen de studie een inschatting van de herhaalbaarheid en een inschatting van de variatie die er is.

De resultaten van studies met andere modellen, zoals bijvoorbeeld met (steriele) infecties (E. Coli, Salmonella, LPS, CFA; zie o.a. proefschrift van Kampman - van de Hoek, 2015), zijn veel moeilijker te vertalen naar de praktijk, omdat deze zonder uitzondering responsen in de klinische range bestuderen (kortdurend, meestal met koortsrespons). Met het sanitaire status model verwachten wij een betere translatie naar de praktijk.

C10. Huisvesting wijkt volgens de onderzoekers af van de Annex III of the Directive 2010/63/EU. Dieren worden individueel gehuisvest gedurende 48 uur en op kale vloer. De huisvesting wijkt hiermee af van de eisen genoemd in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De onderzoeker heeft als argument dat de dieren anders het stro en het rubber opeet, wat een belangrijke invloed kan hebben op het onderzoek.

C18. Dieren van beide geslachten zullen gebruikt worden in de proeven.

Ethische afweging van de DEC:

CITAAT.

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effecten van moeilijk verteerbaar eiwit en vezelrijk voer afkomstig uit bijproducten van de kringlooplandbouw op de functie van de darm en de gezondheid van het dier het gering ongerief voor 260 varkens?
2. Het geringe nadeel voor de proefdieren weegt op tegen het belang van de overige belanghebbenden, zie ook C4 en C5.
3. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

CITAAT. De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de aanpak van de onderzoeker waarbij aan gezonde biggen mest in het verblijf wordt aangebracht afkomstig van bedrijven met verschillende hygiëne status. De IvD heeft daarover het volgende toegelicht: de IvD heeft ingestemd met het huidige voorstel (zoals beschreven in de proposal en de bijlagen)

op basis van eerder behaalde resultaten. Zij is van mening dat deze aanpak interessante resultaten kan opleveren, omdat de techniek al eerder met succes is toegepast. De DEC leden hebben daar een onderling een verschillend standpunt in, hetgeen door hen vanuit verschillende expertise wordt ingebracht in de discussie. Hoewel men het doel volledig kan onderschrijven is er geen unaniem oordeel onder de DEC-leden over het gebruik van mest bij gezonde varkens om verschillende sanitaire toestanden na te bootsen. Enerzijds lijkt met deze methode de kans op herhaald, gevalideerd onderzoek klein omdat de samenstelling van mest immers steeds wisselt. Anderzijds hebben de onderzoeker al veel ervaring met deze werkwijze en zijn de resultaten bruikbaar gebleken en ondervinden de proefdieren mild ongerief. Er zal met worden verzameld van bedrijven waarvan bekend is wat er speelt en wordt geen mest gehaald bij bedrijven met een zware klinische infectie. De onderzoeker heeft echter in de tweede vragenronde de aanpak en de haalbaarheid beter onderbouwt vind het merendeel van de leden. Een van de leden vindt het geen goede proefopzet, omdat het niet gestandaardiseerd kan worden uitgevoerd.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

-In het DEC advies op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. De ethische afweging onder D is niet onderbouwd. U heeft niet aangegeven waarom u de belangen van de proefdieren minder zwaar weegt dan de overige belangen, ook geeft u niet aan welke factoren u heeft meegewogen in het DEC advies. Hierdoor is uw advies niet goed navolgbaar. Uw advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt is wel duidelijk weergegeven.

Bij vraag C10 geeft u aan dat dieren gehuisvest worden afwijkend van bijlage III van de richtlijn. U oordeelt hier echter niet of dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling. Afwijking van bijlage III van de richtlijn is alleen toegestaan als dit om wetenschappelijke redenen of redenen van dierenwelzijn noodzakelijk is.

4 Inhoudelijke beoordeling


3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.

Hergebruik

Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions		
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs		
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: Licht 	

5 Samenvatting

5.2 lid 1

De dieren worden afwijkend van bijlage III van de richtlijn gehuisvest. ³DEC heeft niet beoordeeld of dit noodzakelijk is. **5.2 lid 1**

Het advies van de DEC is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de aanpak van de onderzoeker waarbij aan gezonde biggen mest in het verblijf wordt aangebracht afkomstig van bedrijven met verschillende hygiëne status. Een van de leden vindt het geen goede proefopzet, omdat het niet gestandaardiseerd kan worden uitgevoerd.

Pagina: 5

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 3-7-2020 12:01:18
percentage onbreekt

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 3-7-2020 12:02:16
5.2 lid1

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 3-7-2020 12:15:51
en verzorgd, volgens mij is er een aangepast eetregimen. Niet vasten maar ook niet ad lib

5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

Datum 13 juli 2020

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209705

Instelling: Wageningen University & Research
 Onderzoeker: **5.1 lid2e**
 Project: Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs
 Aanvraagnummer: AVD20209705
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	geen bijzonderheden			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		160	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		100	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions

Varkens (Sus scrofa domesticus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs

Varkens (Sus scrofa domesticus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Huisvesting anders dan bijlage III van de richtlijn: CITAAT "The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs (in an unknown quantity) and can interfere with the dietary treatments and output parameters (nutrient digestion, microbiota, protein fermentation). Pigs will receive toys as enrichment."

"In order to obtain a steady-state in the gastrointestinal tract, pigs will be frequently fed (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). At maximum 48h before dissection, pigs will be housed individually and will be adapted to frequent feeding."

"The experiment will be performed over multiple batches in the climate-controlled respiration chambers. Housing in the climate-controlled respiration chambers is desired for strict separation of the sanitary conditions per unit"

"Housing and care is according to Annex III, except, when pigs are housed individually in pens (48h at max). Individual housing is needed to make sure that every animal consumes feed at each time point a meal is given (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. The pigs will be housed on partially-slatted floor pens with rubber mats. The floor area of the pens in which pigs will be individually housed, will be min. 2 m², allowing the pigs to move around freely. Bedding material is not provided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Rubber mats will be removed 3 days before individual housing, because pigs consume pieces of rubber mat as well (as occurred during a previous pig experiment). During individual housing, pigs will be able to see and hear each other and have snout contact. Animals will receive toys as enrichment."

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	Vraag DEC: De DEC heeft twijfels over de herhaalbaarheid, nauwkeurigheid en toetsbaarheid van het eerste deel van dit project. De sanitaire interventie door mest binnen te halen van andere bedrijven brengt verschillende risico's met zich mee. In de mest kunnen ziektekiemen zitten die het verloop van de proef beïnvloeden. Omdat de samenstelling van mest varieert tussen bedrijven en in de tijd is de vraag gerechtvaardigd hoe representatief en relevant de steekproef is en hoe een experiment herhaald kan worden onder dezelfde condities. Gezien deze opmerkingen vraagt de DEC zich af of onderzoekers niet beter met de experimenten uit bijlage 2 kunnen starten, gevolgd door een
-------------------	--

veldstudie op bedrijven met verschillende hygiënestatus. Indien u blijft bij uw voornemen de experimenten uit bijlage 1 uit te voeren zoals beschreven in bijlage 1, wat is dan de translatie van de verkregen gegevens naar de praktijk?

Reactie aanvrager:Het vooraf inschatten van de gezondheidsstatus van een bedrijf biedt dus geen garantie op een contrast in gezondheidsstatus in de periode van meten, tussen de studie-individuen. Wij denken dat het opleggen van een experimenteel contrast in sanitaire condities daarom geschikter is om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.

Naar aanleiding van de resultaten uit deze veldstudie zijn wij begonnen met het bestuderen van effecten van chronische, milde activering van het immuunsysteem met sanitaire condities, een variant op eerder gepubliceerd onderzoek bij INRA (zie review Pastorelli et al., 2012) en in de USA (Williams et al., 1997). De samenstelling van mest kan inderdaad variëren tussen bedrijven en over tijd, maar met de sanitaire interventie kunnen we een gecontroleerd, praktisch relevant contrast aanbrengen. Inmiddels hebben we in verschillende projecten 4 experimenten gedaan met een contrast in sanitaire condities (1 studie met vleeskuikens, Hollemans et al., unpublished en 3 studies met varkens, van der Meer et al., 2016 en 2020, en van der Peet-Schwering et al., unpublished). De resultaten uit de niet gepubliceerde studies zijn desgevraagd beschikbaar. In alle 4 de studies is het gelukt om een voldoende groot contrast te creëren met deze interventie. Daarnaast leidde het contrast tot verschillen in subklinische gezondheid en NIET tot klinische problemen. Dit maakt deze benadering interessant, vertaalbaar naar de praktijk, maar ook een goed wetenschappelijk model voor de impact van milde, chronische activering van het immuunsysteem. Uiteraard kan het voorkomen dat er ziektekiemen in de mest aanwezig zijn en we realiseren ons dat dit een risico kan zijn en monitoren de klinische gezondheid daarom goed. Daarnaast is het door deze variatie juist van belang om de studie over meerdere batches uit te voeren. Dit betekent dat we de mogelijke verschillen/variatie in de response op de sanitaire interventie kunnen bestuderen. Hiermee maken we dus binnen de studie een inschatting van de herhaalbaarheid en een inschatting van de variatie die er is.

De resultaten van studies met andere modellen, zoals bijvoorbeeld met (steriele) infecties (E. Coli, Salmonella, LPS, CFA; zie o.a. proefschrift van Kampman - van de Hoek, 2015), zijn veel moeilijker te vertalen naar de praktijk, omdat deze zonder uitzondering responsen in de klinische range bestuderen (kortdurend, meestal met koortsrespons). Met het sanitaire status model verwachten wij een betere translatie naar de praktijk.

C10. Huisvesting wijkt volgens de onderzoekers af van de Annex III of the Directive 2010/63/EU. Dieren worden individueel gehuisvest gedurende 48 uur en op kale vloer. De huisvesting wijkt hiermee af van de eisen genoemd in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De onderzoeker heeft als argument dat de dieren anders het stro en het rubber opeet, wat een belangrijke invloed kan hebben op het onderzoek.

C18. Dieren van beide geslachten zullen gebruikt worden in de proeven.

Ethische afweging van de DEC:

CITAAT.

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effecten van moeilijk verteerbaar eiwit en vezelrijk voer afkomstig uit bijproducten van de kringlooplandbouw op de functie van de darm en de gezondheid van het dier het gering ongerief voor 260 varkens?
2. Het geringe nadeel voor de proefdieren weegt op tegen het belang van de overige belanghebbenden, zie ook C4 en C5.
3. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

CITAAT. De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de aanpak van de onderzoeker waarbij aan gezonde biggen mest in het verblijf wordt aangebracht afkomstig van bedrijven met verschillende hygiëne status. De IvD heeft daarover het volgende toegelicht: de IvD heeft ingestemd met het huidige voorstel (zoals beschreven in de proposal en de bijlagen) op basis van eerder behaalde resultaten. Zij is van mening dat deze aanpak interessante resultaten kan opleveren, omdat de techniek al eerder met succes is toegepast. De DEC leden hebben daar een onderling een verschillend standpunt in, hetgeen door hen vanuit verschillende expertise wordt ingebracht in de discussie. Hoewel men het doel volledig kan onderschrijven is er geen unaniem oordeel onder de DEC-leden over het gebruik van mest bij gezonde varkens om verschillende sanitaire toestanden na te bootsen. Enerzijds lijkt met deze methode de kans op herhaald, gevalideerd onderzoek klein omdat de samenstelling van mest immers steeds wisselt. Anderzijds hebben de onderzoeker al veel ervaring met deze werkwijze en zijn de resultaten bruikbaar gebleken en ondervinden de proefdieren mild ongerief. Er zal met worden verzameld van bedrijven waarvan bekend is wat er speelt en wordt geen mest gehaald bij bedrijven met een zware klinische infectie. De onderzoeker

heeft echter in de tweede vragenronde de aanpak en de haalbaarheid beter onderbouwt vind het merendeel van de leden. Een van de leden vindt het geen goede proefopzet, omdat het niet gestandaardiseerd kan worden uitgevoerd.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

-In het DEC advies op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. De ethische afweging onder D is niet onderbouwd. U heeft niet aangegeven waarom u de belangen van de proefdieren minder zwaar weegt dan de overige belangen, ook geeft u niet aan welke factoren u heeft meegewogen in het DEC advies. Hierdoor is uw advies niet goed navolgbaar. Uw advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt is wel duidelijk weergegeven.

Bij vraag C10 geeft u aan dat dieren gehuisvest worden afwijkend van bijlage III van de richtlijn. U beoordeelt hier echter niet of dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling. Afwijking van bijlage III van de richtlijn is alleen toegestaan als dit om wetenschappelijke redenen of redenen van dierenwelzijn noodzakelijk is.

4 Inhoudelijke beoordeling

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.

Hergebruik

Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions		
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs		
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

[Redacted text block]

De dieren worden afwijkend van bijlage III van de richtlijn gehuisvest en verzorgd. De DEC heeft niet beoordeeld of dit noodzakelijk is. 5.2 lid1

[Redacted text block]

Het advies van de DEC is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de aanpak van de onderzoeker waarbij aan gezonde biggen mest in het verblijf wordt aangebracht afkomstig van bedrijven met verschillende hygiëne status. Een van de leden vindt het geen goede proefopzet, omdat het niet gestandaardiseerd kan worden uitgevoerd.

5.2 lid1

[Redacted text block]

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

[Redacted text block]

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



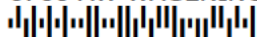
> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Wageningen University & Research

5.1 lid2e

Postbus 59

6700 AW WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1040020209705

Bijlagen

3

Datum 13 juli 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

CONCEPT

Geachte 5.1 lid2e

Op 16 april 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" met aanvraagnummer AVD1040020209705. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 13 juli 2020 tot en met 1 september 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 juni 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:

13 juli 2020

Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



CONCEPT

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Wageningen University & Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 juli 2020 tot en met 1 september 2025, voor het project "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" met aanvraagnummer AVD1040020209705, na advies van dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 16 april 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 25 juni 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 25 juni 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 juni 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions			
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	160	100,0% Licht
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs			
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	100	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet 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

Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 van de wet 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 van de wet 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.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Wageningen University & Research

5.1 lid2e

Postbus 59

6700 AW WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1040020209705

Bijlagen

3

Datum 13 juli 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e,

Op 16 april 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" met aanvraagnummer AVD1040020209705. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2020 tot en met 31 augustus 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 juni 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan vijf jaar mag worden afgegeven.

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 93118, 2509 AC Den Haag.

Datum:

13 juli 2020

Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Wageningen University & Research
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2020 tot en met 31 augustus 2025, voor het project "Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs" met aanvraagnummer AVD1040020209705, na advies van dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 16 april 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 25 juni 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 25 juni 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 juni 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Dietary experiment with piglets under different sanitary conditions			
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	160	100,0% Licht
3.4.4.2. Digestibility experiment with young pigs			
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	100	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet 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

Aanvraagnummer:

AVD1040020209705

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 van de wet 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 van de wet 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.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: dinsdag 3 november 2020 11:03
Aan: dec@wur.nl
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD1040020209705

Geachte DEC Wageningen UR,

Op 16-04-2020 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Effects of dietary composition on intestinal function and health of pigs' met aanvraagnummer AVD1040020209705.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 13-7-2020.

-In het DEC advies op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. De ethische afweging onder D is niet onderbouwd. U heeft niet aangegeven waarom u de belangen van de proefdieren minder zwaar weegt dan de overige belangen, ook geeft u niet aan welke factoren u heeft meegewogen in het DEC advies. Hierdoor is uw advies niet goed navolgbaar. Uw advies is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt is wel duidelijk weergegeven. Bij vraag C10 geeft u aan dat dieren gehuisvest worden afwijkend van bijlage III van de richtlijn. U beoordeelt hier echter niet of dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling. Afwijking van bijlage III van de richtlijn is alleen toegestaan als dit om wetenschappelijke redenen of redenen van dierenwelzijn noodzakelijk is.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl