

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202114588	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 d.d. 23-02-2021				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x		x		x	
3	Bijlage dierproeven_1 bij aanvraag				x		x		x	
4	Bijlage dierproeven_2 bij aanvraag				x		x		x	
5	Bijlage dierproeven_3 bij aanvraag				x					
6	NTS bij aanvraag			x						
7	E-mail aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d. 25-2-2021				x				x	
8	E-mail DEC over advies, d.d. 17-05-2021				x		x		x	
9	DEC-advies, d.d. 14-05-2021				x		x		x	
10	Projectvoorstel na DEC advies				x		x		x	
11	Bijlage dierproeven_1 na DEC advies				x		x		x	
12	Bijlage dierproeven_2 na DEC advies				x		x		x	
13	Bijlage dierproeven_3 na DEC advies				x		x		x	
14	AdviesNotaCCD, d.d. 20-05-2021_met opmerkingen				x		x		x	x
15	AdviesNotaCCD, d.d. 20-05-2021				x		x		x	x
16	E-mail, intern beraad over DEC advies, d.d. 21-05-2021				x		x		x	x
17	E-mail, vragen CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvergunning, d.d. 03-06-2021				x					
18	E-mail CCD aan DEC met verzoek om aanvullend advies, d.d. 03-06-2021				x		x		x	
19	Antwoorden na CCD vragen				x				x	
20	Projectvoorstel na CCD vragen				x		x		x	
21	Bijlage dierproeven_1 na CCD vragen				x		x		x	
22	Bijlage dierproeven_2 na CCD vragen				x		x		x	
23	Bijlage dierproeven_3 na CCD vragen				x		x		x	
24	NTS na CCD vragen			x						
25	E-mail tussen CCD en DEC, d.d. 04-06-2021				x		x		x	x
26	Aanvullend DEC advies, d.d. 10-06-2021				x		x		x	
27	E-mail, intern beraad over aanvullend DEC advies, d.d. 11-6-2021				x		x		x	x

28	E-mail, intern beraad over aanvullend DEC advies, d.d. 15-6-2021				x		x		x	x
29	E-mail, intern beraad over aanvullend DEC advies, d.d. 23-6-2021				x		x		x	
30	AdviesNotaCCD, d.d. 03-07-2021_met opmerkingen				x		x		x	x
31	AdviesNotaCCD, d.d. 03-07-2021				x		x		x	x
32	AdviesNotaCCD, d.d. 20-07-2021				x		x		x	x
33	AdviesNotaCCD, d.d. 26-07-2021_met opmerkingen				x		x		x	x
34	Concept tekst voor beschikking_met opmerkingen				x		x			
35	Beschikking definitief, d.d. 27-07-2021				x		x		x	
36	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over aanvraag projectvergunning, d.d. 21-10-2021				x		x		x	
37	Bezwaar, d.d. 13 oktober 2021				x		x		x	
38	Informatie n.a.v. hoorzitting				x		x		x	
39	Concept beslissing op bezwaar, d.d. 5 januari 2022				x		x		x	
40	Beslissing op bezwaar, d.d. 18 januari 2022				x		x		x	
41	Verslag hoorzitting				x		x		x	
42	Projectvergunning				x				x	



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1

#### Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	5.1 lid2h
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw 5.1 lid2e
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e 5.1 lid2e
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h
		Postcode en plaats	5.1 lid2h
		Postbus, postcode en plaats	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e / 5.1 lid2h
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
	Functie	5.1 lid2e
	Afdeling	5.1 lid2h
	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e / 5.1 lid2h
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer 5.1 lid2h
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 16 - 08 - 2021 Einddatum (t/m) 16 - 08 - 2026
3.2	Wat is de titel van het project?	Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC 5.1 lid2h Postadres 5.1 lid2h



E-mailadres

5.1 lid2h

## 4 Factuurgegevens

- 4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:	Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

- 4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:
--------------

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven: 3
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C 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

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

Plaats

5.1 lid2h

Datum

23-2 - 2021

Handtekening

5.1 lid2e



## Formulier Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- 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 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

## Aanleiding

Deze aanvraag met betrekking tot drachtige en lacterende zeugen en hun biggen is een vervolg op de projectvergunning AVD5.1 lid2h . Hierin worden 5.1 lid2h voor zeugen en biggen onderzocht die een preventieve werking hebben op het gebied van bacteriële ziekten of een suboptimaal werkend immuunsysteem bij biggen rondom het spenen. Het project heeft als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen de belangrijkste infectieuze aandoeningen binnen de varkenshouderij te verbeteren door middel van voer-oplossingen. Hierdoor zijn dieren beter bestand tegen deze frequent voorkomende infecties. Zo kan curatief ingrijpen vaker voorkomen worden.

Het doel is daarbij om veilige en effectieve alternatieven beschikbaar te krijgen voor het gebruik van antibiotica en hoge doseringen aan mineralen in het voer van biggen. Op deze wijze kan diergezondheid en dierenwelzijn van biggen gewaarborgd worden en het milieu gespaard worden.

## Terminologie:

- Microbioom: Het geheel aan symbiotische micro-organismen die in en op een gastheer leven.
- Tonsillen (= keelamandelen): Lymfeklierweefsel gelegen achter in de keelholte op de grens tussen het ademhalingsstelsel en maagdarmkanaal met een belangrijke functie in het immuunsysteem
- Voer(productie)strategieën: grondstofkeuze, nutriëntverhoudingen en fysische eigenschappen van het voer door aanpassingen in het productieproces (zoals deeltjesgrootte van grondstoffen, het ontsluiten van grondstoffen en hardheid van de korrel) door aanpassingen in het productieproces.
- Voeradditieven: toevoegingsmiddelen in voer of drinkwater om diergezondheid te verbeteren. De additieven die getest zullen worden, zijn stoffen, micro-organismen of preparaten die geen voedermiddelen of diergeneesmiddelen zijn. In incidentele proeven gaat het om nieuwe technologieën, zoals inoculatie met darmbacteriën, en supplementen welke niet via voer of drinkwater toegediend kunnen worden, en daardoor via de bek of rectaal ingebracht dienen te worden om hun effect op de microbiota (in de darm en de tonsillen = keelamandelen) en het maag-darmkanaal uit te kunnen oefenen. Het gaat dan om bijvoorbeeld eenmalig toe te dienen stoffen of supplementen voor bijvoorbeeld pasgeboren of zogende biggen, om dat deze nog niet of nauwelijks voer of water opnemen.

## Achtergrond en context

### *Verbeteren diergezondheid en dierenwelzijn*

Binnen dit project richten we ons op het functioneren van het immuunsysteem en op twee zeer belangrijke infectieuze ziekteverwekkers bij biggen, namelijk Escherichia coli (*E. coli*, maagdaandoening) en Streptococcus suis (*S. suis*, luchtwegaandoening). Volgens de gegevens van de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD), het instituut dat pathologisch onderzoek verricht op dieren die vanuit de Nederlandse praktijkbedrijven ingestuurd worden, is in de afgelopen jaren het percentage inzendingen waarbij een maagdaandoening of luchtwegaandoening is vastgesteld, gestegen. De meeste gezondheidsproblemen bij gespeende biggen worden in Nederland toegeschreven aan Streptokokken (nr. 1 met 42%) en *E. coli* (nr. 2 met 8%). Bovendien is volgens data van dit instituut (GD, 2018) *E. coli* met 30% de meest gestelde diagnose voor maagdaandoeningen bij varkens.

Zowel *E. coli* als *S. suis* bacteriën kunnen leiden tot ernstige ziekteverschijnselen en zij zijn verantwoordelijk voor een groot deel van de biggensterfte (Van der Peet-Schwing, 2008; GD Deventer, 2018). Deze ziektes beïnvloeden daarmee diergezondheid en dierenwelzijn negatief. 80% van de Europeanen is van mening dat het dierenwelzijn beter moet worden beschermd dan nu het geval is (Europese Commissie, 2016). In de 'Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023' (2013) is dan ook afgesproken om in de periode naar 2023 toe concrete resultaten in Nederland te boeken voor wat betreft diergezondheid en dierenwelzijn. Hoewel het infectieverloop van *E. coli* en *S. suis* steeds beter bekend zijn, zijn er nog weinig effectieve preventieve maatregelen.

### *Verlaging van gebruik van antimicrobiële middelen*

Ondanks het feit dat diagnoses voor het inzetten van antibiotica niet centraal worden vastgelegd, is het plausibel dat *S. suis* een belangrijke indicatie is voor het inzetten van penicillines (KNMVD, 2014; GD, 2017) en *E. coli* voor het inzetten van colistine (SDa, 2020). Door het antibioticagebruik in de veehouderij te verminderen kan het ontstaan van antibioticaresistenties beperkt worden. Dit is van belang voor dieren- en volksgezondheid, omdat resistente bacteriën van dieren op mensen overgedragen kunnen worden. Dit project draagt daarom indirect bij aan het duurzaamheidsdoel 'volksgezondheid' van de Nederlandse

veehouderij (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023, 2013). Daarnaast is *S. suis* een zoönose, die ook op directe wijze de volksgezondheid in gevaar kan brengen. Als er minder dieren besmet worden met *S. suis*, is het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens. In Europa, zo ook in Nederland, komen *S. suis* infecties met name voor bij varkenshouders en slachthuismedewerkers (Schultsz et al., 2018). In Zuid-Oost Azië en China beperken de *S. suis* infecties zich niet tot deze beroepen en zijn er uitbraken van *S. suis* geweest. In Vietnam is *S. suis* zelfs de belangrijkste veroorzaker van hersenvliesontsteking bij de mens (Trung et al., 2012). Door kennis over de preventie van *S. suis* infecties bij varkens uit te dragen naar nationale en internationale klanten dragen we bij aan het verlagen van het risico op deze zoönose.

Alhoewel de varkenssector erin geslaagd is het totale antibioticagebruik in de varkenshouderij in 2019 te verlagen ten opzichte van 2018, steeg het gebruik van antibiotica die ingezet wordt bij *E. coli* infecties (SDa, 2020). Deze stijging is te koppelen aan het verlagen van het maximumgehalte van mineralen zoals zink (Zn) en koper (Cu) in biggenvoeders.

Zink en koper werden en worden met succes ingezet in hoge doseringen in biggenvoeders met het doel om een sterke daling in kolonisatie van pathogenen en een positief effect op de darmfysiologie (bijvoorbeeld minder villusatrofie na het spenen) te bewerkstelligen. Echter, op basis van de negatieve effecten die Zn en Cu op het milieu hebben, heeft de EU het maximaal toegestane gebruik van Zn en Cu in biggenvoeders beperkt vanaf respectievelijk 2016 (EU 2016/1095) en 2018 (EU 2018/1039). Tevens geeft de EU in deze uitvoeringsverordeningen aan dat er geanticipeerd moet worden op een verdere verlaging van Zn en Cu gehalten bij de volgende herziening (zoals geadviseerd door de EFSA FEEDAP Panel, 2014; 2016). De EU moedigt onderzoekinstellingen aan om snel het gebruik en de doeltreffendheid van alternatieven voor de toevoeging van Zn en Cu te onderzoeken. Vanaf 2022 zal het in de EU verboden zijn om Zn in farmaceutische gehalten toe te voegen aan speenvoeders. Hoewel dit in Nederland al sinds mei 2018 verboden is, moeten sommige andere Europese landen, bijvoorbeeld Denemarken, nog volgen. Om de infectiedruk onder controle te houden is het daarom van essentieel belang om effectieve preventieve maatregelen tegen infectieuze ziekten te zoeken in o.a. de voeding. Hierdoor kunnen concrete stappen tot verduurzaming gezet worden om de bodem- en waterkwaliteit in Nederland te verbeteren (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023, 2013).

### **De invloed van de voeding van zeug en zogende big op darmgezondheid en het immuunsysteem.**

In onderzoek uitgevoerd in de afgelopen jaren onder projectvergunning AVD [5.1 lid2h](#) en in internationaal onderzoek is gezien dat de gezondheid en voeding van de zeug van grote invloed kan zijn op het microbioom van het maagdarmkanaal en de voorste luchtwegen bij haar nakomelingen. Vanaf geboorte tot ongeveer 2 weken na spenen is de microbiota samenstelling in de darm nog volop in ontwikkeling, en nog niet stabiel (Guavarra et al., 2019), waardoor deze gemakkelijk uit balans kan raken. Biggen met en zonder spendiarree als gevolg van *E. coli* besmetting bijvoorbeeld, verschillen niet alleen tijdens de diarree-periode in hun microbiota samenstelling, maar hun darm microbiota is al verschillend enkele weken voor het begin van de diarree, in de periode vóór het spenen (dit [5.1 lid2h](#) 2019; Dou et al., 2017). Dit geeft aan dat de darmkolonisatie een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van diarree en dat de darm microbiota in het 'vroege leven' van de biggen het latere risico op diarree kan beïnvloeden. De darmkolonisatie in het vroege leven wordt grotendeels beïnvloed door de zeug. Biggen worden namelijk relatief steriel geboren, waarbij ze de microbiota van de zeug meekrijgen tijdens geboorte (uit de mest en geboorte kanaal) en na geboorte (via colostrum, melk, huid en mest). Op de dag van geboorte is er dan ook een grote overeenkomst in de darm microbiota van de zeug en haar biggen. Dit biedt mogelijkheden om de kolonisatie van darmbacteriën van de biggen te moduleren via voerstrategieën bij de zeug rondom het werpen.

Ook *S. suis* kan reeds tijdens de geboorte (Amass et al., 1996) of tijdens het zogen van de zeug naar de biggen worden overgebracht. Daarnaast kunnen biggen de bacterie op elkaar overdragen in kraamstal of gespeende biggenstal (Dekker et al., 2013). Kolonisatie van *S. suis* in een gezonde big kan plaatsvinden zonder dat het dier ziek wordt (ontstaan van zogenaamde dragers).

Uit eerder onderzoek binnen [5.1 lid2h](#) is gebleken dat het voor een deel van de voerstrategieën en additieven zinvol kan zijn om de voeding van zeugen en zogende biggen mee te nemen in de gebruikte modellen. Daarom worden in dit projectvoorstel niet alleen modellen bij gespeende biggen beschreven maar ook modellen waarbij de voeding van de zeug en zogende biggen reeds meegenomen wordt. Voor de praktijk is het haalbaar en nuttig om al vroegtijdig, dus bij voeding en management van de zeug en zogende biggen in te grijpen zodat dierziektes preventief kunnen worden aangepakt. In dit kader kan ook de interactie van voerconcepten met vaccinaties volgens de reguliere praktijk meegenomen worden in het onderzoek.

### Escherichia coli infecties

Escherichia coli (E. coli) is een gram-negatieve bacterie, welke zich koloniseert in het maag-darmkanaal. E. coli infecties kunnen zich uiten in diarree in de eerste week na geboorte (18% van de gezondheidsproblemen bij zogende biggen), waarbij vaak de hele toom ziek is. Daarnaast komt het veel voor in de eerste 2 weken na het spenen (nr. 2 van de gezondheidsproblemen bij gespeende biggen).

De darm microbiota kunnen door veranderingen in de omgeving, zoals het spenen, uit balans raken. Door verandering in voer en stress op het moment van spenen eet een big tijdelijk niet tot zeer weinig. Als het dier daarna weer begint met eten, krijgt de E. coli bacterie de kans zich te vermenigvuldigen onder invloed van aanwezigheid van veel onverteerd substraat in de darm en een onbalans in microbiota samenstelling. Om ziekte te veroorzaken moet de E. coli zich via aanhechtingsfactoren (zoals F4) aan de wand van de dunne darm hechten. Vervolgens produceert hij toxines (zoals hitte labiel/stabiel toxine) welke de darmcellen aantasten, wat resulteert in een verminderde absorptie en toename van vochtverlies via de darm. Kenmerkend voor een E. coli infectie is (waterige) diarree, verminderde absorptie door aantasting van de darmvilli (bij gespeende biggen), verminderde groei, en sterfte door uitdroging.

### Preventie van E. coli infecties door middel van voeding

Onderstaand worden enkele voorbeelden beschreven van voer(productie)strategieën en additieven die op het moment van schrijven het meeste perspectief bieden om via voeding invloed uit te oefenen op E. coli bacteriën en hun toxines:

- *Voer(productie)strategieën:*
  - Grondstofkeuze, nutriëntverhoudingen en fysische eigenschappen van het voer kunnen van grote invloed zijn op het voorkomen van E. coli infecties.  
Hierbij kan gedacht worden aan verlaging van het eiwitgehalte rondom spenen, het toevoegen van prebiotica zoals voedingsvezels en bijvoorbeeld het optimaliseren van het aandeel aan fermenteerbare en inerte koolhydraten (5.1 lid2b, 5.1 lid2c 2014). Hierbij is ook het moment waarop (bijvoorbeeld rondom werpen) niveaus aan koolhydraten hoger ofwel lager zijn van belang (Cheng et al. 2018, Feyera et al. 2017). De werkingsmechanismen die van belang zijn binnen deze strategische wijzigingen in nutritionele kenmerken kunnen variëren: de darm microbiota samenstelling kan bijvoorbeeld wijzigen, de darm barrière functie kan verbeterd worden of de kwaliteit en/of kwantiteit van de colostrum kan verbeteren. Ook de verteerbaarheid van nutriënten en aanwezigheid van antinutriële factoren (ANF's) in grondstoffen spelen een rol. ANF's, bijvoorbeeld glucosinolaten in raapzaad en alkaloiden in aardappelwit (Liener et al. 1994) kunnen een irriterend effect hebben op de darmwand hebben of de verteerbaarheid negatief beïnvloeden. Door grondstoffen met ANF's te behandelen (verhitten, extractie, concentraat) kunnen ANF's worden geïnactiveerd en kan de weerbaarheid tegen E. coli worden verbeterd.
- *Additieven, bijvoorbeeld:*
  - *Organische zuren:* Ook organische zuren zouden een positief effect kunnen hebben op het voorkomen van E. coli infecties (Jiménez et al., 2020; Suiryanrayna and Ramana, 2015; Tsiloyiannis et al., 2001), door de positieve invloed op vertering van nutriënten en hun antimicrobiële functie.
  - *Probiotica en fermentatieproducten:* Probiotica zijn levende bacteriën en gisten (bijv. Saccharomyces cerevisiae: Trevesi et al., 2015, 2017) die een positief effect op de gezondheid hebben wanneer ze in voldoende hoeveelheden worden geconsumeerd. Via verschillende routes kunnen probiotica E. coli infecties voorkomen (Dubreuil, 2017; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2016). Dit kan via competitie op het gebied van aanhechting aan de darmwand of voor het beschikbare voedsel in de darm, productie van antimicrobiële bestanddelen zoals bacteriotoxinen en effecten op het immuunsysteem. Onder andere op 5.1 lid2h is gebleken dat probiotica ook de vertering van nutriënten kunnen verbeteren, waardoor er minder beschikbaar voedsel is voor E. coli om zich te vermeerderen. Het succes van probiotica in de preventie van E. coli infecties is o.a. afhankelijk van de gebruikte micro-organismen en hun interactie met de voercomponenten. Uit onderzoek van 5.1 lid2h is ook gebleken dat fermentatieproducten van bepaalde Lactobacillus stammen als alternatief voor hoge concentraties van zink oxide ingezet zou kunnen worden om E. coli infecties te voorkomen (5.1 lid2h, 2017).
  - *Orale antilichamen:* Orale antilichamen kunnen voorkomen dat de E. coli zich kan hechten aan de dunne darm (Virdi et al., 2013; 2019).



### **Streptococcus Suis infecties**

Streptococcus suis (S. suis) is een gram-positieve bacterie. Deze bacterie kan op verschillende manieren en momenten overgedragen worden, namelijk

- direct van zeug op big tijdens de geboorte en tijdens het zogen
- tussen biggen onderling in kraamstal en gespeende biggenstal
- via materialen
- via de lucht en
- via mensen

S. suis (serotype 2) is ook een zoönose. Dit betekent dat bij overdracht van de bacterie van varkens(vlees) op mensen, mensen ernstige ziekteverschijnselen kunnen krijgen, zoals bijv. hersenvliesontsteking.

De S. suis bacterie komt voor in de bovenste luchtwegen (hecht voornamelijk aan de tonsillen en neusholtes), het genitaal stelsel en het maag-darmkanaal van varkens. Kolonisatie van S. suis in een gezonde big kan plaatsvinden zonder dat het dier ziek wordt (dier wordt dan drager genoemd). Echter, bij kolonisatie van een virulente stam van S. suis (overdracht via een besmet varken met virulente S. suis stam in de groep) of bij een verminderde afweer van het dier (bijv. door een virus infectie, stress van spenen, transport stress, verandering in voer) kunnen deze bacteriën op later moment leiden tot ernstige klinische verschijnselen. Zo zorgt bijvoorbeeld E. coli besmetting voor verzwakking van de weerstand van biggen, waardoor er gemakkelijker een S. suis infectie kan opspelen, bijvoorbeeld na het spenen. Rondom spenen is de prevalentie van S. Suis infecties dan ook het hoogst.

De pathogenese van S. suis wordt tot dusver nog niet volledig begrepen. De eerste stappen van infectie zijn bacteriële kolonisatie (hechting en vermeerdering), waarna translocatie over de epitheliale barrière plaatsvindt naar de circulatie toe, gevolgd door verspreiding naar verschillende organen. Bij varkens speelt de kolonisatie van de bovenste luchtwegen waaronder de tonsillen (Gaiser et al., manuscript in voorbereiding) en het maag-darmkanaal een belangrijke rol bij infecties van S. suis bij biggen (Wertheim et al., 2009; Su et al., 2008).

Voedingsstoffen, voornamelijk koolhydraten, in de mondholte en het maag-darmkanaal worden door S. suis bacteriën gebruikt om zich te vermeerderen. Wanneer S. suis in de circulatie terecht komt, kunnen de bacteriën zich aanhechten aan de endotheelcellen van bijvoorbeeld de bloedhersenbarrière, gewrichten of hartkleppen leidend tot hersenvliesontsteking, gewrichtsontsteking of hartklepontsteking en secundair longontsteking. Ook kunnen de bacteriën aanleiding geven tot een ongereguleerde afgifte van ontstekingsmediatoren vanuit de lever, wat meestal leidt tot plotselinge sterfte. Vooral hersenvliesontsteking gaat vaak gepaard met koorts, waardoor biggen met hersenvliesontsteking snel kunnen uitdrogen en plots dood kunnen gaan. Biggen met minder ernstige symptomen van een S. suis infectie maken een zieke indruk, hebben weinig eetlust, lopen moeilijk en hebben koorts. S. suis infecties kunnen snel (binnen 24 uur) leiden tot tientallen sterftegevallen, waardoor tijdig ingrijpen van groot belang is. De acute vorm kan ook overgaan tot een chronische vorm met blijvende kreupelheid. Tot op heden is er geen commercieel vaccin beschikbaar dat effectief beschermt tegen alle S. suis-serotypen. In Nederland wordt wel door diverse zeugenbedrijven preventief gevaccineerd met een bedrijfsspecifiek vaccin (autovaccin).

### **Preventie van S. suis infecties door middel van voeding**

Omdat S. suis o.a. in de darmen, het speeksel en op de tonsillen voorkomt zijn er mogelijkheden om S. suis infecties te voorkomen door middel van voer(productie)strategieën en voeradditieven. Onderstaand worden enkele voorbeelden beschreven van strategieën en additieven die op het moment van schrijven het meeste perspectief bieden:

- *Voer(productie)strategieën:*

S. suis groeit het beste op koolhydraten en zetmeel, waardoor een andere voersamenstelling het beschikbare voedsel voor S. suis en daardoor de groei ervan zou kunnen verminderen. Welke voercomponenten (bijv. monosachariden, disachariden of polysachariden) exact een rol spelen in de virulentie van S. suis is nog onbekend (Ferrando et al., 2014). Daarnaast lijkt 'overprocessing' van zetmeel invloed te hebben op de groei van S. suis (5.1 lid2h, 2018).

- *Additieven, bijvoorbeeld:*

- *Middelketen lange vetzuren:* Er zijn aanwijzingen dat middelketen lange vetzuren in het voer door hun directe antimicrobiële effect de groei van S. suis zouden kunnen remmen (Jackman et al., 2020; Dierick et al., 2002).
- *Organische zuren:* Een mix van organische zuren in het drinkwater van gespeende biggen kan de kolonisatie van S. suis op de tonsillen verminderen (5.1 lid2h, 2020) door de maag pH laag te houden

- *Probiotica*: Probiotica gegeven aan zeugen of zogende biggen (via oraal supplement) zouden de microbiota ontwikkeling van biggen zo kunnen beïnvloeden dat *S. suis* zich niet kan koloniseren ('competitive exclusion' genoemd).

Onderzoek voor wat betreft preventie van *S. Suis* is volop in ontwikkeling, dus ook andere voeroplossingen kunnen waarschijnlijk perspectief bieden in de preventie van *S. suis*, zoals bijvoorbeeld producten die de hoeveelheid onverteerd substraat in de darm laag kunnen houden en die de darm barrière functie kunnen versterken.

### **Een verminderde immuun competentie: ontstekingsreacties en oxidatieve stress**

Immuun competentie omvat het vermogen van een dier om adequaat te reageren op immunologische bedreigingen. Het dier beschikt over een arsenaal aan verdedigingsmechanismen tegen bedreigingen, die samen dit vermogen bepalen. De immuun competentie van een dier wordt mede bepaald door de interactie tussen voer, de darm microbiota en de cellen van het immuun systeem in de darmwand.

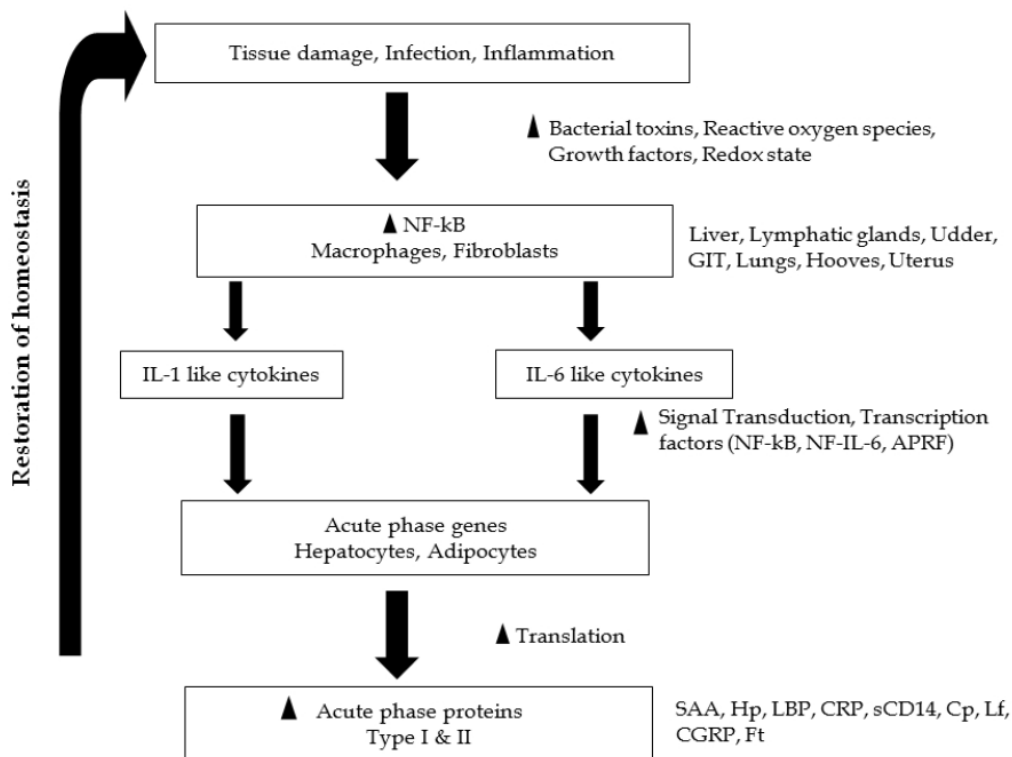
In de dunne darm zit 70-80% van de immuuncellen (Furness et al., 1999; Vighi et al., 2008) en ook de immuunactivatie en het imprints van het immuunsysteem bij jonge dieren vindt hier plaats (bijv. Clarke, et al., 2010; Hall et al., 2008; Smith et al., 2007; Round & Mazmanian, 2009). Het immuun systeem van de darm moet zich na de geboorte nog verder ontwikkelen. De ontwikkeling van de darmbacteriën begint tijdens het geboorteprocés en loopt door na het spenen (Frese et al., 2015). Deze darmbacteriën zijn van grote invloed op de ontwikkeling van het immuun systeem in de darm. Omdat de immuun competentie vorm krijgt in de eerste levensweken, kan deze bij (landbouwhuis)dieren worden verbeterd door matemale of neonatale nutritionele interventie.

Voerstrategieën op jonge leeftijd hebben meestal een langdurig effect op de immuun competentie, terwijl deze op latere leeftijd een meer tijdelijk effect hebben. Daarom is het belangrijk om de immuun ontwikkeling van biggen al vanaf een jonge leeftijd (pre- en postnataal) optimaal te ondersteunen middels voeding (van de zeug en zogende biggen).

Daarnaast zorgen veranderende omgevingsomstandigheden tijdens het spenen van biggen ervoor dat de immuun competentie van biggen meer onder druk komt te staan en het immuun systeem geactiveerd wordt. Zo ontstaan door de stress en de lage voeropname beschadigingen aan de darmwand, waardoor pathogenen gemakkelijker een infectie kunnen veroorzaken. Daarnaast is de voerovergang op spenen verantwoordelijk voor een grote verandering in de darm microbiota (Frese et al., 2015). Deze veranderingen vinden plaats terwijl er geen passieve immuniteit van de zeug meer is na het spenen, en de actieve immuniteit van de big zich nog volop aan het ontwikkelen is.

### Reactie van het immuunsysteem op infecties en darmschade.

In figuur 1 wordt weergegeven hoe het immuunsysteem reageert op bedreigingen voor het organisme (bijvoorbeeld infectieuze aandoeningen, weefselbeschadiging, ontsteking, toxines).



Figuur 1. Activatie van het immuunsysteem en responsparameters (Ametaj et al. 2010)

De belangrijkste regulator in het lichaam voor wat betreft ontstekingen is de zogenaamde transcriptie factor NF-κB (Pantano et al., 2006, Ametaj 2010). Deze NF-κB wordt bij herkenning van pathogene infecties en/of darmschade geactiveerd. Ook een overmaat aan oxidanten zorgt voor activatie van NF-κB. De activatie van NF-κB zorgt voor verhoging van de productie van specifieke signaal eiwitten, de cytokines. Er zijn zowel cytokines die de ontsteking stimuleren (pro-inflammatoire cytokines zoals IL-1, IL-6 en TNF-α) als cytokines die de ontsteking remmen (anti-inflammatoire cytokines zoals IL-4 en IL-10). In geval van darmschade en infecties komen de pro-inflammatoire cytokines vrij (Moya et al., 2006; Nordgreen et al., 2018). Door het vrijkomen van deze pro-inflammatoire cytokines, komen prostaglandinen vrij in de hypothalamus, het hersendeel dat de temperatuurregulatie verzorgt, en verandert het 'set-point' van de lichaamstemperatuur. Hierdoor treedt koorts op. De cytokines circuleren door het lichaam en met name de lever reageert hierop door acute fase-eiwitten (zoals haptoglobine) te maken (Carroll et al., 2005; Moya et al., 2006). Cytokines, acute fase-eiwitten en de lichaamstemperatuur worden daarom veelal gebruikt om de immuun competentie van biggen bij infecties in kaart te brengen.

#### Functie van vrije radicalen.

Tijdens cel metabolisme, inclusief immuunsysteemprocessen, worden vrije radicalen (ROS = Reactive Oxygen Species = oxidanten) geproduceerd. Vrije radicalen zijn zeer onstabiele verbindingen die leiden tot de vorming van reactieve peroxiden in de cellen. Vrije radicalen en peroxiden reageren met en beschadigen verschillende cel componenten, tenzij ze worden afgebroken tot minder reactieve verbindingen door zogenaamde antioxidanten.

Antioxidanten zijn stoffen die deelnemen aan chemische reacties die oxidatieve schade voorkomen. Oxidatieve stress wordt beschouwd als het resultaat van een onbalans tussen de productie van ROS en het vermogen van het lichaam om met antioxidanten ROS af te breken (Reuter et al., 2010; Pi et al., 2010). Als het anti-oxidatieve afweersysteem tekort schiet, wordt het immuunsysteem beperkt in zijn functie. Naast een verminderde immuniteit zorgt een onbalans met hoge ROS concentraties voor spierafbraak, verlies van eetlust, diarree, leverschade en uiteindelijk celdood, die de functie en overleving van het hele dier beïnvloeden (Yin et al., 2013).

In biggen komt oxidatieve stress met name voor na het spenen (Zhu et al., 2012). Oxidatieve stress houdt rechtstreeks verband met ontsteking vanwege het feit dat oxidanten NF-κB kunnen activeren. Ontsteking van de darm na het spenen gaat daarom ook gepaard met oxidatieve stress. Biggen zijn na het spenen

daarom extra gevoelig voor het oplopen van infectieuze ziektes. Om de negatieve effecten van deze veranderingen na het spenen (onbalans in darm-fysiologie, -microbiota, en -immunologie) zo goed mogelijk op te vangen, is het van belang om vóór en na het spenen het immuunsysteem van biggen optimaal te ondersteunen. Daarom wordt er gezocht naar voer(productie)strategieën en voeradditieven die een positieve bijdrage kunnen leveren aan de immuun competentie van biggen.

### Het bevorderen van de immuun competentie via voeding

Omdat het immuunsysteem van biggen nog volop in ontwikkeling is en het grootste gedeelte van de immuuncellen voorkomen in de darmwand, biedt dit de mogelijkheid om de immuun competentie van biggen te bevorderen door middel van voer(productie)strategieën en additieven zoals bijvoorbeeld:

- *Voer(productie)strategieën:*
  - *Amino-zuren:* Toevoeging van bepaalde amino-zuren zoals arginine of aspartaat in het speenvoer kan zorgen voor bijvoorbeeld een verbeterde antioxidant status of verbeterde darm morfologie en barrièrefunctie (Bergeron et al., 2014; Pi et al., 2014).
  - *Vetzuren:* Bepaalde meervoudig onverzadigde vetzuren in het voer lijken de darmintegriteit van gespeende biggen te verbeteren (Liu et al., 2012).
  - *Mineraalbron:* Uit onderzoek op 5.1 lid2h is gebleken dat het gebruik van een organische selenium bron in het voer in plaats van een anorganische selenium bron een positief effect had op de immuun respons van gespeende biggen na immuun stimulatie, door de productie van anti-inflammatoire cytokines te stimuleren en oxidatieve stress te verminderen (5.1 lid2h, 5.1 lid2e).
- *Additieven, bijvoorbeeld:*
  - *Harszuren:* Harszuren uit naaldbomen hebben een anti-inflammatoire werking en als deze aan het voer van gespeende biggen toegevoegd worden dan hebben deze biggen een lagere concentratie van een darmontsteking biomarker en een veranderde cytokine productie dan biggen zonder harszuren in het voer (5.1 lid2h, 2020).
  - *Pre- en probiotica:* Er zijn indicaties dat pre- en probiotica de productie van pro- en anti-inflammatoire cytokines, en daarmee de immuun competentie van biggen, kan beïnvloeden (San Andres et al., 2019; Chen et al., 2020).

### Invloed van het voeren van de zeug en/of zogende biggen

De voeding van de zeug tijdens dracht, rondom werpen en tijdens lactatie, en de voeding van zogende biggen, kan ook invloed hebben op de immuuncompetentie van gespeende biggen. Zo hadden gespeende biggen waarvan de zeugen gist extract *Pichia guilliermondii* in het voer kregen tijdens dracht en lactatie meer antilichaam IgG in het bloed en een veranderde immuuncel populatie en immuunrespons dan gespeende biggen van controle zeugen. Bovendien waren de effecten op de immuunrespons sterker (additief effect) wanneer de biggen dit gist extract zelf ook in het voer na spenen kregen (Bass, 2012). Daarnaast produceerden bepaalde immuuncellen van zogende biggen die oraal gesupplementeerd werden met  $\beta$ -glucanen meer van anti-inflammatoire cytokine IL-10 dan biggen die geen  $\beta$ -glucanen binnenkregen (De Vries et al., 2020).

### Onderzoek

Binnen dit project worden strategieën getest die erop gericht zijn om de balans van het microbioom in maagdarm kanaal en / of luchtwegen en het immuunsysteem bij biggen te verbeteren.

Om strategieën en additieven op een effectieve en gecontroleerde wijze te testen heeft 5.1 lid2h drie verschillende diermodellen ontwikkeld /in gebruik. Binnen twee van deze modellen wordt gebruik gemaakt van goed gekarakteriseerde en milde stammen van de twee meest voorkomende bacteriën in de varkenshouderij. Binnen deze modellen is het doel om de kolonisatie van de bacteriën met voeding tegen te gaan. Met het derde model wordt direct het immuunsysteem geactiveerd en hiermee kan het effect van voeding op immuun competentie worden getest.

Uit onderzoek onder onze vorige projectvergunning is gebleken dat we met het E. coli kolonisatie model, het S. suis kolonisatie model en het LPS immuun competentie model goede resultaten kunnen boeken voor wat betreft het vinden van alternatieve voermaatregelen, welke vertaald kunnen worden naar de praktijk. Afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie en zijn werkingsmechanisme kunnen deze getest worden in één van onderstaande modellen, welke gericht zijn op een specifiek onderdeel van het immuunsysteem:

- E. coli kolonisatie model: Dit model wordt ingezet wanneer voeradditieven of voer(productie)strategieën gebruikt worden die een specifiek effect zouden hebben op E. coli infecties bij biggen. In het model worden gespeende biggen oraal geïnoculeerd met een milde stam van E. coli. De dieren ontwikkelen voor enkele dagen milde symptomen zoals dunne mest.

*De uitscheiding van E. coli en mestconsistentie zijn de belangrijkste uitleesparameters zijn.*

- S. suis kolonisatie model: Dit model wordt ingezet wanneer voeradditieven of voer(productie)strategieën gebruikt worden die een specifiek effect zouden hebben op de kolonisatie van S. suis bij biggen. In het model worden gespeende biggen oraal en nasaal geïnoculeerd met een milde stam van S. suis. De dieren kunnen tijdelijk lichte symptomen zoals een verhoogde lichaamstemperatuur vertonen.

*De kolonisatie van S. suis op de tonsillen en de uitscheiding in de darmen zijn de belangrijkste uitleesparameters.*

- LPS immuun competentie model: Het best gekarakteriseerde model voor immuun activatie en oxidatieve stress in biggen is de lipopolysaccharide (LPS) geïnduceerde immuun activatie, welke in deze aanvraag 'LPS immuun activatie model' genoemd zal worden. LPS is een bestanddeel van bacteriewanden, welke (binnen enkele uren) een acute ontstekingsreactie kan veroorzaken (zie Figuur 1). De ontstekingsreactie na LPS injectie activeert onder andere enzymen die vrije radicalen vormen, waardoor er oxidatieve cel schade ontstaat (Kadiska et al., 2015). LPS is daarom ook een goed model voor oxidatieve stress in biggen (Hou et al., 2014).

*Parameters passend bij oxidatieve stress en reactie van de lever, zoals acute fase eiwitten, cytokines en lever enzymen zijn de belangrijkste uitleesparameters.*

## Referenties

- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. EFSA Journal 2014;12(5):3668, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3668
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2016. Scientific opinion on the revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. EFSA Journal 2016;14(8):4563, 100 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4563
- Europese Commissie. 2016. Uitvoeringsverordening (EU) 2016/1095 tot verlening van een vergunning voor zinkacetaat-dihydraat, watervrij zinkchloride, zinkoxide, zinksulfaat-heptahydraat, zinksulfaat-monohydraat, zinkchelaat van aminozuren, gehydrateerd, zinkchelaat van eiwithydrolysaten, zinkchelaat van glycinehydraat (vast) en zinkchelaat van glycinehydraat (vloeibaar) als toevoegingsmiddelen voor diervoeding voor alle diersoorten en tot wijziging van Verordeningen (EG) nr. 1334/2003, (EG) nr 79/2006, (EU) nr. 335/2010 en Uitvoeringsverordeningen (EU) nr. 991/2012 en (EU) nr. 636/2013. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R1095&from=EN>
- Europese Commissie. 2018. Uitvoeringsverordening (EU) 2018/1039 tot verlening van een vergunning voor koper(II)diacetaat-monohydraat, koper(II)carbonaatdihydroxide-monohydraat, koper(II)chloride-dihydraat, koper(II)oxide, koper(II)sulfaat-pentahydraat, koper(II)chelaat van aminozuren, gehydrateerd, koper(II)chelaat van eiwithydrolysaten, koper(II) chelaat van glycine, gehydrateerd (vast), en koper(II)chelaat van glycine, gehydrateerd (vloeibaar), als toevoegingsmiddelen voor diervoeding voor alle diersoorten en tot wijziging van de Verordeningen (EG) nr. 1334/2003, (EG) nr. 479/2006 en (EU) nr. 349/2010 en de Uitvoeringsverordeningen (EU) nr. 269/2012, (EU) nr. 1230/2014 en (EU) 2016/2261. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1039&from=NL>
- Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023. 2013. [5.1 lid2h](#), [5.1 lid2e](#)
- GD Deventer, 2018. Monitoring diergezondheid varkens: rapportage eerste halfjaar 2018. Online Monitor: stand van zaken 2018. p19-21.
- Ametaj B.M. et al. Review of Acute Phase Proteins for monitoring inflammatory states in cattle. ISBN:978-953-307-873-1. InTech. <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-as-early-non-specific-biomarkers-of-human-and-veterinary-diseases/application-of-acute-phase-proteins-for-monitoring-inflammatory-states-in-cattle>.
- Dou S, Gadonna-Widehem P, Rome V, Hamoudi D, Rhazi L, Lakhali L, et al. (2017) Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. PLoS ONE 12(1): e0169851.
- Schultsz, C., D. van Dijk, J.A. Wagenaar, A. van der Ende. 2018. Zoönotische infecties met Streptococcus suis in Nederland. <https://www.rivm.nl/zoönotische-infecties-met-streptococcus-suis-in-nederland>. Publicatiedatum: 2013. Wijzigingsdatum: 2018.
- Trung, H.D., N, Le Thi Phuong T, Wolbers M, Nguyen Van Minh H, Nguyen Thanh V, Van MP, et al. 2012. Aetiologies of Central Nervous System Infection in Viet Nam: A Prospective Provincial Hospital-Based Descriptive Surveillance Study. Plos One. 7(5):e37825.
- Van der Peet-Schwering C.M.C., Binnendijk G.P, Kuijken N., Raymakers R. (2008). Beheersing van Streptococcus suis bij gespeende biggen door managementmaatregelen. Animal Sciences Group Wageningen UR. Rapport 119
- Europese Commissie. 2016. Special Eurobarometer 442 – Attitudes of Europeans towards animal welfare. <https://ec.europa.eu/commfrontoffice/downloadODP/?B5163B36F9C7BD6AA12FF2DBD4E1DF19>
- SDa, autoriteit diergeneesmiddelen. 2020. Rapport 'Het gebruik van antibiotica bij landbouwhuisdieren in 2019.' [https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergeneesmiddelen/userfiles/sda%20jaarrapporten%20ab-gebruik/ab-rapport-2019/sda-rapport-het-gebruik-van-antibiotica-bij-lhd-in-2019-\(1\).pdf](https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergeneesmiddelen/userfiles/sda%20jaarrapporten%20ab-gebruik/ab-rapport-2019/sda-rapport-het-gebruik-van-antibiotica-bij-lhd-in-2019-(1).pdf)
- GD Deventer, 2017. Rapport van het project 'Bedrijfskenmerken, bedrijfsinrichting, diergezondheid en factoren in kennis – houding – gedrag op zeugen- en vleesvarkensbedrijven met een laag versus een hoog antibioticumgebruik'. <https://edepot.wur.nl/430324>



- KNMvD, 2017. Richtlijn Streptococcus suis bij gespeende biggen. <https://www.knmvd.nl/app/uploads/2018/07/RICHTLIJN-STREPTOCOCCUS-SUIS-DEF-APRIL-2014.pdf>
- Guavarra, R.B., Lee, J.H., Lee, S.H., Seok, M.J., Kim, D.W., Kang, B.N. et al. 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2019) 10:1.
- Virdi, V., Palaci Bataller, J., Laukens, B., Ryckaert, S., Cox, E., Vanderbeke, E., Depicker, A., Callewaert, N. 2019. Yeast-secreted, dried and food-admixed monomeric IgA prevents gastrointestinal infection in a piglet model. *Nature Biotechnology* 37(5), 527–530.
- Virdi, V., Coddens, A., De Buck, S., Millet, S. et al. 2013. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Proc Natl Acad Sci* 110(29):11809-14.
- Dubreuil, J.D. 2017. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know?. *Biosci Microbiota Food Health*. 36(3):75-90. doi:10.12938/bmfh.16-030
- Wang, J., Zeng Y., Wang S., Liu, H., Zhang, D., Zhang, W., Wang, Y., Ji, H. 2018. Swine-Derived Probiotic *Lactobacillus plantarum* Inhibits Growth and Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Mediates Host Defense. *Front. Microbiol.* 9.
- Zhang W, Zhu Y-H, Zhou D, Wu Q, Song D, Dicksved J, Wang J-F. 2017. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function following *Escherichia coli* challenge in newly weaned pigs of genotype MUC4 that are supposed to be enterotoxigenic *E. coli* F4ab/ac receptor negative. *Appl Environ Microbiol* 83:e02747-16
- Jiménez, M.J., Berrios, R., Stelzhammer, S., Hohmann, M., Verri Jr. W. et al. 2020. Ingestion of organic acids and cinnamaldehyde improves tissue homeostasis of piglets exposed to enterotoxic *Escherichia coli* (ETEC). *Journal of Animal Science*:1–11.
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., & Mills, D. A. 2015. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0091-8>
- Suiryanrayna, M.V., Ramana, J.A. 2015. Review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J Animal Sci Biotechnol* 6, 45.
- Tsiloyiannis VK, Kyriakis SC, Vlemmas J, Sarris K. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res Vet Sci.* 70(3):287-93.
- 5.1 lid2b, 5.1 lid2c van Oostrum M, Pérez JF, Mateos GG, Nyachoti CM, van der Aar PJ. 2014. Relevance of functional properties of dietary fibre in diets for weanling pigs. *Anim Feed Sci Technol.* 189:1–10.
- Bass, Benjamin Edward. 2012. Influence of Nutritional Modifications on Sow, Litter, and Nursery Performance. Theses and Dissertations.
- De Vries, H., M. Geervliet, C.A. Jansen, V.P.M.G. Rutten, H. van Hees, N. Groothuis et al. 2020. Impact of Yeast-Derived  $\beta$ -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. *Microorganisms* 8, 1573
- Amass, S.F., Clark, L.K., Knox, K., Wu, C.C., Hill, M.A. *Streptococcus suis* colonization of piglets during parturition. *Swine Health Prod.* 1996;4:269–272.
- Dekker, N., Bouma, A., Daemen, I., Klinkenberg, D., van Leengoed, L., Wagenaar, J.A. et al. 2013. Effect of Spatial Separation of Pigs on Spread of *Streptococcus suis* Serotype 9. *PLoS ONE* 8(4): e61339.
- Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci* 34:31-67.
- Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *J Anim Sci Biotechnol.* 2020;11:44.
- Dierick N, Decuyper J, Molly K, Van Beek E, Vanderbeke E. 2002. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. *In vitro* screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livest Prod Sci.* 75:129–142.
- Trevisi P, Colombo M, Priori D, Fontanesi L, Galimberti G, Calò G, Motta V, Latorre R, Fanelli F, Mezzullo M, Pagotto U, Gherpelli Y, D'Inca R, Bosi P. 2015. Comparison of three patterns of feed supplementation with live *Saccharomyces cerevisiae* yeast on postweaning diarrhea, health status, and blood metabolic profile of susceptible weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4ac. *J Anim Sci.* 93(5):2225-33.
- Trevisi, P., Latorre, R., Priori, D., Luise, D., Archetti, I., Mazzoni, M., D'Inca, R., Bosi, P. 2017. Effect of feed supplementation with live yeast on the intestinal transcriptome profile of weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4. *Animal*, 11(1), 33-44.
- Cheng, C., Hongkui Wei, Chuanhui Xu, Xiaowei Xie, Siwen Jiang, Jian Peng. 2018. Maternal Soluble Fiber Diet during Pregnancy Changes the Intestinal Microbiota, Improves Growth Performance, and Reduces Intestinal Permeability in Piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (17) e01047-18
- Feyera T, Højgaard CK, Vinther J, Bruun TS, Theil PK. Dietary supplement rich in fiber fed to late gestating sows during transition reduces rate of stillborn piglets. *J Anim Sci.* 2017 Dec;95(12):5430-5438.
- Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci.* 90(8):2581-9.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology & medicine*, 49(11), 1603–1616.
- Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME. 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):77-83.
- 5.1 lid2h
- Ferrando ML, van Baarlen P, Orrù G, et al. 2014. Carbohydrate availability regulates virulence gene expression in *Streptococcus suis*. *PLoS One.* 2014;9(3):e89334.
- Furness JB, Kunze WA, Clerc N. 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol.* 277(5):G922-8.
- Vighi, G., Maruccci, F., Sensi, L., Di Cara, G., & Frati, F. 2008. Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and experimental immunology* 153, Suppl 1, 3–6.
- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. 2010. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med.* 16(2):228-31.
- Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y. 2008. Commensal DNA Limits Regulatory T Cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses. *Immunity* 29(4): 637-649.
- Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C. 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis.* 48(5):617-25. PMID: 19191650.
- Smith K., McCoy K. D., Macpherson A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59–69
- Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(5):313-23.
- San Andres, J.V., Gabriel A Mastromano, Yanshuo Li, Huyen Tran, Justin W Bundy, Phillip S Miller, Thomas E Burkey. 2019. The effects of probiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs, *Translational Animal Science* 3:1315–1325.

- Chen, F., Houjun Wang, Jiayi Chen, Yang Liu, Wei Wen, Yinghui Li, Xingguo Huang. 2020. Lactobacillus delbrueckii Ameliorates Intestinal Integrity and Antioxidant Ability in Weaned Piglets after a Lipopolysaccharide Challenge. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 6028606, 10 pages.
- Bergeron, N., Robert, C., Guay, F. 2014. Feed supplementation with arginine and zinc on antioxidant status and inflammatory response in challenged weanling piglets. *Animal Nutrition* 3(3):236-246.
- Pi D, Liu Y, Shi H, Li S, Odle J, Lin X, et al. 2014. Dietary supplementation of aspartate enhances intestinal integrity and energy status in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge. *J Nutr Biochem*. 25:456-62.
- Pantano C., Reynaert N. L., van der Vliet A., and Janssen-Heininger Y. M.. 2006. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal*. 8:1791-1806.
- Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S.K. 2012. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *J Nutr* 142(11):2017-24.
- Waititu, S.M., J.M. Heo, R. Patterson, C.M. Nyachoti. 2016. Dietary yeast-based nucleotides as an alternative to in-feed antibiotics in promoting growth performance and nutrient utilization in weaned pigs. *Can J Anim Sci*, 96:3.
- Wu, C., Xu, Q., Wang, R., Qing, X., Peng, X., Hu., L., Liu, Y. et al. 2018. Effects of dietary  $\beta$ -glucan supplementation on growth performance and immunological and metabolic parameters of weaned pigs administered with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Food Funct*. 9, 3338-3343.
- Moya, S.L., Boyle, L., Lynch, P.B., and Arkins, S. 2006. Pro-inflammatory cytokine and acute phase protein responses to low-dose lipopolysaccharide (LPS) challenge in pigs. *Animal Science* 82: 527-534
- Nordgreen, J., Munsterhjelm, C., Aae, F., Popova, A., Boysen, P. et al. 2018. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on inflammatory markers in blood and brain and on behavior in individually-housed pigs. *Physiology & Behavior* 195:98-111.
- Carroll, J.A., Carter, D.B., Korte, S.W., Prather, R.S. 2005. Evaluation of the acute phase response in cloned pigs following a lipopolysaccharide challenge. *Domest Anim Endocrinol* 29(3):564-72.
- Williams et al, 2009. Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 37(3):139-147.
- Terenina, E., Valérie Sautron, Caroline Ydier, Darya Bazovkina, Amélie Sevin-Pujol, et al. 2017. Time course study of the response to LPS targeting the pig immune gene networks. *BMC Genomics, BioMed Central* 18, ff10.1186/s12864-017-4363-5ff.
- Kadiiska MB, Peddada S, Herbert RA, et al. 2015. Biomarkers of oxidative stress study VI. Endogenous plasma antioxidants fail as useful biomarkers of endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 81:100-106.
- Hou X, Zhang J, Ahmad H, Zhang H, Xu Z, et al. (2014) Evaluation of Antioxidant Activities of Ampelopsin and Its Protective Effect in Lipopolysaccharide Induced Oxidative Stress Piglets. *PLoS ONE* 9(9): e108314.
- Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. 2017. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 3(4):313-321.
- AgroVision, 2020. Kenggetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari - december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.
- Knecht D, Cholewińska P, Jankowska-Mąkosza A, Czyż K. 2020. Development of Swine's Digestive Tract Microbiota and Its Relation to Production Indices-A Review. *Animals (Basel)*10(3):527.
- Buchet A, Belloc C, Leblanc-Maridor M, Merlot E. 2017. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PLoS ONE* 12(5): e0178487.
- Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., Klünter, A. 2019. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250: 9-31.
- Lallès J-P and Fagerhol MK 2005. Faecal calprotectin: a non-invasive marker of inflammation in pigs? *ISAH* 1, 405-408.
- Lemoine N., Fautrel A. Técher M., Guillou D., 2018. Validation of a quantitative biomarker of gut inflammation in weaned piglets. 14th International Symp. Digest. Physiol. Pigs, Brisbane, Australia.
- Rubio, C.P., Mainau, E., Cerón, J.J. et al. 2019. Biomarkers of oxidative stress in saliva in pigs: analytical validation and changes in lactation. *BMC Vet Res* 15, 144.

## 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

### Doelstelling

De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen. Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en *E. coli* en *S. suis* infecties te verminderen.

### Uiteindelijke doel:

Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale [5.1 lid2h](#). Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.

Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Hieronder vallen drie subdoelen:

het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:

- het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen
- het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen
- de immuun competentie van gespeende biggen

### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De doelstellingen zijn realistisch en haalbaar, omdat:

- alle expertise die nodig is beschikbaar is op 5.1 lid2h waar de proeven worden uitgevoerd is een onafhankelijk 5.1 lid2h voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvragen te beantwoorden. Beschikbare expertises zijn kennis van fysiologie, (darm)gezondheid, microbiologie, grondstoffen, voederwaardering, nutritionele behoeften en gedrag. Het personeel is deskundig en de onderzoekers in dienst hebben een Ir-, MSc-, DVM- of PhD-titel. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan de projecten, waardoor voortgang en kwaliteit van het project is gewaarborgd.
- de doelstelling is gebaseerd op voorgaand onderzoek in varkens door 5.1 lid2h en anderen (review over E. coli en LPS modellen: Adewole et al., 2016).
- 5.1 lid2h veel ervaring heeft opgebouwd met het uitvoeren van dit type onderzoeksprojecten. Dit is namelijk een vervolgprojectaanvraag, als vervolg van vergunning AVC5.1 lid2h De modellen zijn de afgelopen jaren doorontwikkeld, waarbij er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie wordt gevonden (E. coli en S. suis kolonisatie model) of een duidelijke immuunrespons (LPS immuun competentie model) met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen en ongerief (Luise et al., 2019). Zo is de wijze van besmetting met S. suis ingewikkeld, maar door 5.1 lid2h doorontwikkeld tot een werkend model door verschillende inoculatiemethoden te testen. Ook voor E. coli heeft 5.1 lid2h na uitvoerige studie en testen een voldoende geconcentreerd en functioneel E. coli inoculum ontwikkeld. Daarnaast hebben we het droge stof gehalte van mestmonsters bepaald om het mest consistentie protocol objectiever te maken en te kunnen vergelijken met andere 5.1 lid2h Qua ziekteverschijnselen onderscheiden de 'kolonisatie' modellen van 5.1 lid2h zich van E. coli en S. suis 'infectie' modellen in de literatuur voor wat betreft de mortaliteit ten gevolge van de inoculatie (o.a. Becker et al., 2020; Pallarés et al., 2003) welke we hebben kunnen reduceren met behoud van een goed resultaat voor wat betreft effectiviteit van het model. Daarnaast is uit onderzoek tijdens de afgelopen jaren binnen 5.1 lid2h gebleken dat het zeer zinvol kan zijn om invloed uit te oefenen op de gezondheid van biggen door middel van voerstrategieën en voeradditieven bij de zeugen (met name rondom werpen), omdat biggen via de zeug al besmet kunnen worden met E. coli of S. suis. Om deze reden worden ook de zeugen benoemd in dit project en in de uitvoering van het onderzoek.
- samengewerkt wordt met nationale en internationale onderzoeksinstellingen in projecten waarbij zowel universiteiten als private bedrijven betrokken zijn zodat geavanceerde technieken op efficiënte wijze gebruikt kunnen worden. Deze kennis is vervolgens beschikbaar voor de klanten (5.1 lid2h 5.1 lid2h bedient meer dan 5.1 lid2h 5.1 lid2h inhoudelijke kennis op grondstoffen gebied en voorlichting. Op deze manier draagt 5.1 lid2h bij aan de ambitie 'kennis, leervermogen en innovatie' ter verduurzaming van de Nederlandse veehouderij (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij, 2013). Op wereldwijd niveau bedient 5.1 lid2h op moment van schrijven 5.1 lid2h Dit betekent dat de (hier) gegenereerde kennis er voor zorgt dat de gezondheids- en welzijnsstandaard in grote stappen naar een hoger niveau kan worden gebracht via het netwerk, wat ook belangrijk is voor verduurzaming van de Nederlandse veehouderij.

#### Referenties

- Adewole DI, Kim IH, Nyachoti CM. Gut Health of Pigs: Challenge Models and Response Criteria with a Critical Analysis of the Effectiveness of Selected Feed Additives - A Review. Asian-Australas J Anim Sci. 2016;29(7):909-924.
- Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., Trevesi, P. 2019 Methodology and application of Escherichia coli F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. Journal of Animal Science and Biotechnology (2019) 10:53.
- Becker, S.L., Li, Q., Burrough, E.R., Kenne, D., Sahin, O., Gould, S.A., and Patience, J.R. 2020. Effects of an F18 enterotoxigenic Escherichia coli challenge on growth performance, immunological status, and gastrointestinal structure of weaned pigs and the potential protective effect of direct-fed microbial blends. Journal of Animal Science 98: 1-10

Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Schmitt, C.S., Roth, J.A., Opriessnig, T. et al. 2003. Comparison of experimental models for *St reptococcus suis* infection of conventional pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 67: 225-228.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

### 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

#### Wetenschappelijk belang

Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbiom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.

#### Maatschappelijk belang

*E. coli* en *S. suis* infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (*E. coli*), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (*S. suis*). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met *S. suis*, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (*S. suis* is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

#### Zeugen en biggen

Met behulp van effectieve voerstrategieën en voeradditieven bij zeugen en biggen kan de gezondheid en het welzijn van jonge biggen verbeterd worden. Wanneer voerconcepten bij de zeugen getest worden, wordt er geen of een positief effect verwacht omtrent de gezondheid en het welzijn van de zeugen.

#### 5.1 lid2h

Het belang van 5.1 lid2h is dat zij hun voerstrategieën en voerconcepten kunnen verbeteren zodat zij hun klanten, de varkenshouders, beter kunnen adviseren met betrekking tot gezondheid en welzijn van hun biggen en daarmee een vermindering van ziekte en antibioticumgebruik.

#### Consument

Preventie van infectieuze aandoeningen en verbetering van de werking van het immuunsysteem zal leiden tot een verminderd antibioticumgebruik, minder resistentievorming voor antibiotica en minder besmettingen van mensen met *S. suis* en daardoor minder risico's voor de volksgezondheid.

#### Varkenshouders

Varkenshouders kunnen hun beroep met de meeste voldoening en de beste kosten-efficiëntie uitoefenen indien zij voorzien worden van actuele kennis met betrekking tot voeding en gezondheid van hun dieren. Daarbij dienen zij de gezondheid van hun dieren te waarborgen binnen de milieu-wetgeving. Het sparen van het milieu en het waarborgen van de gezondheid van hun dieren staan regelmatig op gespannen voet, daarom is praktijkgericht onderzoek en advies m.b.t. dit onderwerp van groot belang. Daarnaast zijn veehouders in nauw contact met hun dieren en aangezien *S. suis* een ziekte is waarvoor zij gevoelig zijn hebben zij er belang bij dat ziekte door deze bacterie wordt voorkomen.

#### Leveranciers van (voer)additieven

Het belang van leveranciers van voeradditieven is dat zij de effectiviteit van hun producten kunnen aantonen voor wat betreft preventie van bacteriële aandoeningen en werking van het immuunsysteem.



- Milieu

De milieuwetgeving wordt voor de varkenshouderij strenger. Het verminderen van het gebruik van hoge doseringen aan koper en zink is ongewenst en slecht voor het milieu. Indien de gezondheid van varkens verbeterd kan worden zonder grote hoeveelheden van deze mineralen te voeren is dit winst voor het milieu.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Het doel van het project is het optimaal ondersteunen van de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen ziektes.

Voorafgaand aan iedere proef binnen dit project worden de volgende vragen gesteld om te bepalen of de proef uitgevoerd zal worden:

- Omvat de proef het testen van een voeradditief of voer(productie)strategie?
- In het geval van het testen van een voeradditief, is het additief *in vitro* of voor andere doelstellingen of bij andere diersoorten getest met positief resultaat?
- Kan de kennis die met de aanvraag wordt verkregen op Nederlands en Europees niveau worden toegepast?

Als op 1 of meerdere van bovenstaande vragen 'nee' geantwoord wordt, zal de proef niet plaatsvinden.

Als op alle bovenstaande vragen 'ja' geantwoord is zullen de volgende vragen gesteld worden om tot de beste proefopzet te komen:

- Wat is de achtergrond van het voeradditief of de voer(productie)strategie?
- Wat is het werkingsmechanisme van het voeradditief of de voer(productie)strategie; is het gericht op E. coli, óf S. suis óf het moduleren van het immuunsysteem?
- Zijn er aanvullende monsters nodig om de onderzoeksvraag te beantwoorden? Zo ja, welk type en welke frequentie van bemonstering is nodig?
- In het geval van een voeradditief, hoe dient het additief verwerkt te worden (bijv. gepelleerd voer, ongepelleerd voer, drinkwater) en in welke dosering(en)?

Antwoorden op deze vragen worden gezocht in de literatuur, gebaseerd op kennis en ervaring binnen <sup>5.1 lid2h</sup> gebaseerd op informatie van de toeleverancier en/of gebaseerd op *in vitro* onderzoek.

In varkensvoerders worden regelmatig meerdere additieven tegelijkertijd gebruikt. De werking van additieven hoeft niet altijd elkaar versterkend te zijn; zo kunnen producten een overlappend werkingsmechanisme hebben, of een tegenstrijdig effect (bijvoorbeeld een combinatie van organische zuren en probiotica). Daarom kunnen in proeven binnen dit project combinaties van voeradditieven binnen één behandeling worden getest om dit effect te onderzoeken.

Binnen dit project worden drie modellen gebruikt die een verschillend onderdeel van de gezondheid belichten. De strategieën zullen in één van deze modellen worden getest, omdat deze specifiek op een onderdeel van de gezondheid werken en het dus niet zinnig is om het product in meerdere modellen te testen. Het effect van voerstrategieën en voeradditieven op de kolonisatie van E. coli zal worden bestudeerd in het E. coli kolonisatie model (**Bijlage 1**), waar het effect op de kolonisatie van S. suis bestudeerd zal worden in het S. suis kolonisatie model (**Bijlage 2**). Wanneer het product geen specifieke werking heeft tegen E. coli of S. suis, maar (de ontwikkeling van) het immuunsysteem kan beïnvloeden, wordt het LPS immuun competentie model ingezet (**Bijlage 3**).

Om de doelstelling van dit project te behalen voert <sup>5.1 lid2h</sup> toegepast onderzoek uit, zowel collectief onderzoek (op thema basis) als individueel contractonderzoek.

Het collectief onderzoek. Onderzoek dat uitgevoerd wordt voor collectieven van <sup>5.1 lid2h</sup> hebben veelal als doel voerconcepten te ontwikkelen, waarin voeradditieven en voer(productie)strategieën op de meeste effectieve wijze kunnen worden ingezet om de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen ziektes optimaal te ondersteunen. De opzet en uitvoering van het onderzoek wordt vastgesteld door onderzoekers gezamenlijk met een wetenschappelijk team, consultants en een afvaardiging (nutritionisten en R&D) uit het collectief van <sup>5.1 lid2h</sup> om de relevantie en toepasbaarheid voor de praktijk te garanderen. Onderzoeksresultaten worden besproken met deze zelfde afvaardiging en vervolgens breed gedeeld aan alle <sup>5.1 lid2h</sup> in het collectief (zie **Figuur 2**). Er wordt ook samengewerkt met verschillende (internationale) onderzoeksinstituten. Op het moment van schrijven wordt er in een EU-



project met 13 partners uit 9 Europese landen samengewerkt aan nieuwe voerstrategieën en voeradditieven als alternatief voor het gebruik van antimicrobiële middelen, specifiek tegen speendiarree door E. coli. Ook werkt **5.1 lid2h** op het moment van schrijven samen met 7 partners in een **5.1 lid2h** om S. suis infecties bij biggen te verminderen.

**Figuur 2.** Diverse stadia van het collectief onderzoek. Onder onderzoekers worden de onderzoekers van **5.1 lid2h** verstaan.



Het contractonderzoek bestaat voornamelijk uit onderzoek naar de effectiviteit van voeradditieven en voer(productie)strategieën in biggen. Dit betreft producten die ontwikkeld worden door toeleveranciers van **5.1 lid2h** of specifieke vragen van hen over het effect van bepaalde factoren (bijv. voerproductie). Samen met de R&D-afdeling van de opdrachtgever wordt door de onderzoekers een proefopzet vastgesteld.

### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Het onderzoek dat wordt uitgevoerd voor een collectief van **5.1 lid2h**, is onderzoek dat gewenst en nuttig is voor nationale en internationale **5.1 lid2h**. Omdat onderzoeken voor deze vaste klanten als basis kunnen dienen voor vervolgonderzoek, wordt de verkregen kennis optimaal benut. **5.1 lid2h** bedient meer dan 95% van de Nederlandse **5.1 lid2h** op inhoudelijke kennis op grondstoffen gebied en voorlichting. Op wereldwijd niveau bedient **5.1 lid2h** op moment van schrijven 10% van de **5.1 lid2h**. Dit betekent dat de (hier) gegenereerde kennis er voor zorgt dat de gezondheids- en welzijnsstandaard in grote stappen naar een hoger niveau kan worden gebracht via het netwerk. De **5.1 lid2h** zijn tevens de belangrijkste adviseurs op voergebied van de veehouders. Daarom heeft dit onderzoek veel invloed op de kennis en toegepaste strategie van veehouders met betrekking tot het voeren van varkens zodat deze dieren gezond blijven en het gebruik van antibiotica en mineralen kan worden gereduceerd waardoor het milieu niet teveel belast wordt. **5.1 lid2h** werkt daarnaast nauw samen met kennis- en onderzoeksinstituten binnen Nederland en daarbuiten die kennis genereren en ontwikkelingen monitoren op het gebied van bijvoorbeeld de gezondheid van dieren en diagnostische technieken. Hierdoor kunnen resultaten en waarnemingen zeer efficiënt worden gebruikt om de doelstellingen te bereiken.

Het contractonderzoek wordt uitgevoerd voor klanten die veelbelovende (voer)additieven willen onderwerpen aan onderzoek zodat deze producten op de markt kunnen worden ingezet. Door via literatuuronderzoek en / of eerder onderzoek een goede voorbereidende studie te doen naar werkingsmechanismes van de additieven wordt het onderzoek zo effectief mogelijk opgezet. Het onderzoek wordt daarom wel als op zichzelf staand onderzoek uitgevoerd, maar reeds bekende resultaten uit eerder onderzoek bij een zelfde type product worden zo zorgvuldig mogelijk meegenomen bij het opzetten van het onderzoek.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen
2	Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen
3	Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

Volgnummer	Titel dierproef
1	Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## Inleiding

Escherichia coli (E. coli) infectie is de meest gestelde diagnose voor maagdarmaandoeningen bij varkens. Zoals omschreven in het projectvoorstel, zijn biggen extra gevoelig voor E. coli infecties na het spenen, omdat de darm microbiota dan uit balans raakt en de darmintegriteit afneemt, waardoor E. coli makkelijker kan koloniseren. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en vaccins die ingezet worden in de praktijk.

Omdat uit onderzoek van 5.1 lid2h en de literatuur is gebleken dat biggen met speendiarree al kunnen verschillen in hun darm microbiota vóór het spenen, worden de voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage niet alleen toegepast in het voer voor gespeende biggen, maar kunnen deze ook verstrekt worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen.

In deze laatste gevallen kunnen de langere termijn effecten van deze strategieën op speendiarree onderzocht worden. In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op het verloop van E. coli kolonisatie. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden. Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën worden ontwikkeld voor de praktijk om zo de (darm)gezondheid, en daarmee het welzijn, van varkens te verbeteren (minder diarree en sterfte), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica en zink te verminderen.

## Experimentele aanpak

Bij het veroorzaken van ziekte spelen aanhechtingsfactoren (zoals bijv. F4) en specifieke toxines, zoals hitte labiel/stabiel toxine, een belangrijke rol. De E. coli stammen op 5.1 lid2h zijn gekarakteriseerd op deze kenmerken, zodat het onderzoek uitgevoerd wordt met een voor de praktijk relevante E. coli stam. De afgelopen jaren is uit onderzoek op 5.1 lid2h gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen de darm kolonisatie van biggen in de kraamstal beïnvloed kan worden, welke vervolgens een grote rol spelen in gezondheid van biggen na spenen. Naast voeding van zeug en biggen voor spenen, speelt ook de (abrupte) voerovergang op het moment van spenen een rol in het risico op E. coli kolonisatie na het spenen, waardoor het belangrijk kan zijn onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom wordt onderzoek gedaan met proefopzetten waarin de voeding van de zeug, de zogende big en/of de gespeende big een rol kan spelen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethoden

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)		
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gepeende biggen		Inoculatie E. coli gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van inoculatie	Gebruik antibioticum <sup>c</sup>
1	Ja				Ja	Dag 4	Nee
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4	Nee
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4	Nee
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-14	Nee
5			Ja		Ja	Dag 4-14	Ja

<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in de kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van inoculatie is afhankelijk van de lengte van de proefvoeradaptatieperiode van het testproduct

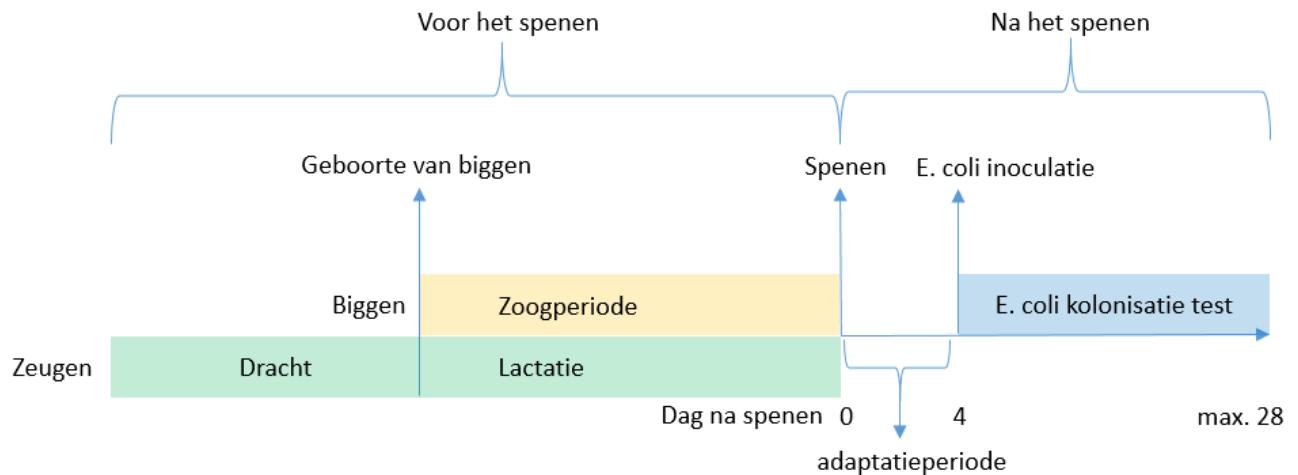
<sup>c</sup> Antibioticum behandeling t.b.v. standaardisatie microbiom biggen

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op E. coli kolonisatie na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te inoculeren na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab wordt bepaald of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen.

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnoculeerd worden met E. coli op dag 4 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnoculeerd kunnen worden met E. coli. Het moment van inoculeren is dus flexibel, maar wel altijd tussen 4 en 14 dagen na het spenen.

**Ad c.** Bij methode 5 wordt uitsluitend naar het effect van de proefbehandeling bij gespeende biggen gekeken. Daarom worden de biggen voor wat betreft aanwezigheid van *E. coli* in het maagdar kanaal zoveel mogelijk gestandaardiseerd met behulp van een antibioticumkuur om mogelijke zeugen effecten te verminderen.

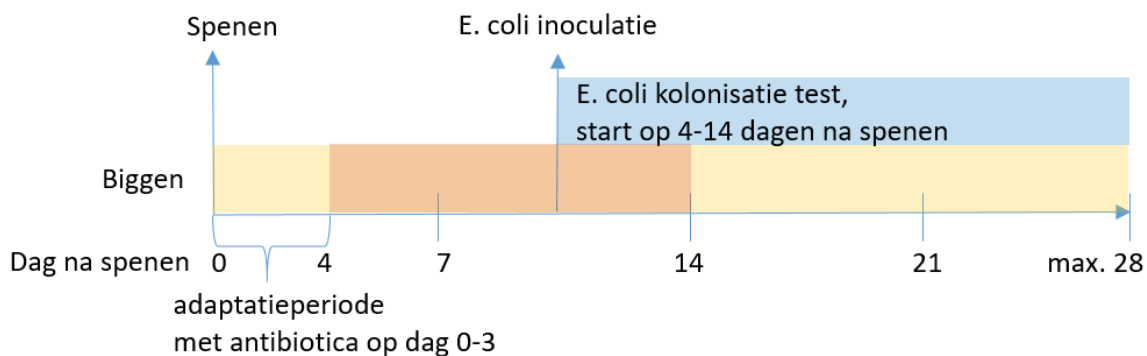
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnoculeerd met *E. coli*.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen, worden behandeld met een smalspectrum antibioticum. De gespeende biggen worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waarna de biggen geïnoculeerd worden met *E. coli*. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de *E. coli* inoculatie kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



## **Algemeen**

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waardoor de E. coli kolonisatie test zal starten op 4-14 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de E. coli kolonisatie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### E. coli kolonisatie test (uitscheiding van E. coli bestuderen)

De E. coli kolonisatie test start met het oraal inoculeren van de biggen met een mild pathogene E. coli stam. Vervolgens zal de uitscheiding van E. coli in de mest en de mestconsistentie van individuele biggen bestudeerd worden. Omdat in de praktijk de ziekteverschijnselen als gevolg van E. coli met name optreden in de eerste twee weken na spenen (van 4 tot 6 weken leeftijd), start de E. coli kolonisatie test binnen deze leeftijdscategorie. Dit is van belang omdat het immuunsysteem en maagdarmkanaal met darmmicrobioom van de biggen op die leeftijd nog volop in ontwikkeling is, en leeftijd daarom een belangrijke rol speelt in de effecten die gevonden zullen worden. De dieren in de proef zijn dan wat betreft ontwikkelingsstadium zoveel mogelijk gelijk zijn aan de dieren onder praktijkomstandigheden.

## **Uitkomstparameters**

De primaire uitkomstparameters in de E. coli kolonisatie test zijn:

1. De uitscheiding van E. coli in de mest
2. De mestconsistentie
3. De immunestatus
4. Het darmmicrobioom

De uitscheiding van E. coli in de mest en de mestconsistentie zijn de meest belangrijke parameters aangezien het in het hier beschreven onderzoek gaat om het bepalen van de afweer van biggen tegen speendiarree veroorzaakt door E. coli. Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte en medische behandelingen).

Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen omtrent de immunestatus en het darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

---

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### Inoculatie met E. coli bacteriën:

De E. coli kolonisatie test start door een bekende dosis van een mild pathogene stam van E. coli bacteriën oraal in de bek van de gespeende big te spuiten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 5 minuten
Frequentie:	1 x
Wijze:	Oraal met een spuitje in de bek

### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen, het bepalen van de uitscheiding van E. coli, het bepalen van de mestconsistentie en eventuele aanvullende parameters zoals het darmmicrobioom of vluchtige vetzuren zijn verse mestmonsters of rectale swabs nodig. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 15 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

**Onderbouwing:** De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en omvat het nemen van een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Voor het bepalen van de mestconsistentie en de uitscheiding van E. coli bij gespeende biggen is het niet mogelijk om mestmonsters vanaf de vloer te verzamelen, omdat bacteriën zich vermenigvuldigen na uitscheiding, waardoor er een vertekend beeld kan ontstaan.

Verse mestmonsters kunnen bij zeugen en biggen ook nodig zijn voor andere waarnemingen, zoals vluchtige vetzuren in de mest. Vaak worden de mestmonsters dan tevens gebruikt ter bepaling van het darmmicrobioom. Een rectale swab kan ook gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen en wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Bloedmonsters

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er bloedmonsters verzameld moeten worden.

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 3 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie, hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

**Onderbouwing:** Bloedmonsters worden genomen om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Het is met name van belang om de immuunrespons en darmintegriteit in kaart te brengen (Celi et al., 2019). Zo brengen toxines geproduceerd door E. coli een sterke immuunrespons op gang (Cox et al., 2006; Loos et al., 2012) en is er bijvoorbeeld een stijging in acute fase eiwitten en inflammatoire cytokines na E. coli toediening (o.a. Lee et al., 2012). Bloedmonsters kunnen ook vóór E. coli kolonisatie genomen worden om het werkingsmechanisme van voerstrategieën bij de zeugen of zogende biggen te achterhalen of om zeugen of biggen te genotyperen (bijv. MUC13) op gevoeligheid voor E. coli.

### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of en wanneer er monsters na euthanasie verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef, bijv. de helft van de dieren op de piek van E. coli uitscheiding en de helft van de dieren wanneer de E. coli uitscheiding sterk gedaald is. Bij methode 1 t/m 4 kan het bovendien nodig zijn monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit kan noodzakelijk zijn om de uitscheiding van E. coli, het darm microbioom, de pH en korte-keten vetzuren in verschillende segmenten van de darm te bestuderen en om bijvoorbeeld de lokale immuunrespons in de darmwand en darmontwikkeling/morfologie en -integriteit te onderzoeken.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speeksel- of urinemonsters of tonsil swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen, of vaginale swabs van zeugen.

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze speeksel:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen
Wijze urine:	Spontane urinelozing

Onderbouwing:

Dit draagt bij om het werkingsmechanisme van de voerstrategie te bestuderen. Zo kunnen er in speekselmonsters biomarkers voor de gezondheidsstatus bepaald worden, zoals antilichamen, en kunnen urinemonsters ingezet worden om de nutriëntenbenutting, en dus indirect darmgezondheid, te kunnen bestuderen.

### Vaginale swab

Dieren:	Zeugen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 4 x per cyclus

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de vagina. Dit kan relevant zijn, omdat bij de geboorte van biggen hun darm microbiota wordt gevormd door de microbiota van de zeug, inclusief de microbiota in het geboortekanaal.

### Tonsil swab

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Tonsil swabs kunnen worden ingezet om de relatie tussen darm microbiota en tonsil microbiota te onderzoeken. De inzet van probiotica bijvoorbeeld kan mogelijk de hoeveelheid substraat voor E. coli verminderen. Onderzoek van het microbioom van de tonsillen is daarom incidenteel informatief in dit type onderzoek.

### Rectale temperatuur

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	2 x daags
Moment:	Eerste 5 dagen na inoculatie

Onderbouwing: Als responsparameter is de lichaamstemperatuur momenteel nog niet onderkend als een goede voorspeller / indicator van het ziekteverloop van E. coli, omdat het onnauwkeurig kan zijn vanwege waterige uitwerpselen in het rectum, de bewegingen van het dier en stress van het hanteren. Echter, voor monitoring van de gezondheid van de biggen na inoculatie worden de biggen 2 x daags getemperatuur en vaker indien nodig.

### Handelingen die alleen in proeven met uitsluitend gespeende biggen zullen worden uitgevoerd (methode 5 in Tabel 1)

#### Behandeling met een smalspectrum antibioticum

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	3 dagen*

Wijze:	Via het drinkwater
--------	--------------------

#### Onderbouwing:

Op deze wijze wordt de uitscheiding van E. coli voor de start van de voerstrategieën gestandaardiseerd en worden mogelijke zeug effecten verminderd.

\*Wanneer verwacht wordt dat de testproducten een vergelijkbaar effect geven op E. coli uitscheiding als smalspectrum antibiotica, kan er ook een proefgroep ter vergelijking ingezet worden waarbij de biggen van spenen tot het einde van de proef via het drinkwater behandeld worden met een smalspectrum antibioticum (Luise et al., 2019).

#### Referenties

- Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., Klünter, A. 2019. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250: 9-31.
- Cox E., Verdonck F., Vanrompay D., Goddeeris B. (2006). Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Veterinary Research* 37, 511-539.
- Lee, J.S., Awji, E.G., Lee, S.J., Tassew, D.D., Park, Y.B., Park, K.S., Kim, M.K., Kim, B., Park, S.C. Effect of *Lactobacillus planetarium* CJLP243 on the growth performance of cytokine response of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci.* 2012;90:3709–3717.
- Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., Trevesi, P. 2019 Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2019) 10:53.
- National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.
- Loos, M., Geens, M., Schauvliege, S., Gasthuys, F., van der Meulen, J., Dubreuil, J. D., Goddeeris, B. M., Niewold, T., & Cox, E. (2012). Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS one*, 7(7), e41041.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse, worden gegevens uit eerdere proeven op 5.1 lid2h of uit de literatuur gebruikt. Uit onze eerdere onderzoeken is gebleken tot 10-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van E. coli en in mestconsistentie. Het exacte aantal zeugen en biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	180	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	360	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	900	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van 5.1 lid2h.
Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op E. coli besmetting bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari -december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.

Aantal	<u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u> 3 proeven in 5 jaar, 2-8 behandelingen per proef, 10-15 zeugen per behandeling. Gemiddeld 3 proeven x 6 behandelingen x 10 zeugen = 180 zeugen <u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u> 3 proeven per jaar, 2-8 behandelingen per proef, 14-16 biggen per behandeling. 3 proeven x 6 behandelingen x 14 dieren = 252 biggen x 5 jaar = 1260 biggen. Hiervan worden 900 biggen (zowel voor als) na spenen ingezet (3 proeven per jaar x 6 behandelingen x 10 dieren = 180 biggen x 5 jaar = 900 biggen). De andere 360 biggen worden alleen tot spenen gevolgd om biggen te kunnen selecteren die voldoende vast voer hebben opgenomen in de kraamstal.
Geslacht	Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek. Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

### C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018).

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

#### Referenties

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.  
Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluijvers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, orale inoculatie met E. coli, mestmonsters, bloedafname). Ook fixatie (voor inoculatie en bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens.
- Verwacht wordt dat de dieren milde klinische verschijnselen zullen ontwikkelen na de E. coli inoculatie, waaronder diarree en een verminderde voeropname, gewichtstoename en activiteit (maar wel alert). Matige en ernstige klinische verschijnselen, en dus ook medische behandelingen en uitval, ten gevolge van de inoculatie zijn in voorafgaande proeven niet voorgekomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen).
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de E. coli inoculatie.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat ruime ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren tot minder onrust leidt. Het inoculeren gebeurt door middel van een spuitje in de bek. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt.
- Alvorens oraal E. coli toegediend zal worden aan gespeende biggen, vindt er eerst een adaptatieperiode plaats. Het spenen van biggen kan namelijk stressvol ervaren worden door de gelijktijdige veranderingen die optreden in voer en (sociale) omgeving. Door een adaptatieperiode in te lassen, vindt het toedienen van E. coli plaats op een moment welke minder stressvol is voor de biggen. Hierdoor wordt het risico op ongerief beperkt. Bovendien is dit ook noodzakelijk voor de proefopzet, omdat als de E. coli afweer test direct na spenen uitgevoerd zal worden, de resultaten zeer variabel zullen zijn wegens grote variatie in stress geassocieerd met spenen tussen de dieren.
- Er wordt gebruik gemaakt van een mild pathogene stam van E. coli bacteriën waardoor ernstige ziekteverschijnselen (zoals ernstige uitdrogingsverschijnselen) voorkomen worden. Uit voorgaande proeven op 5.1 lid2h is gebleken dat er geen toename in uitval of medische behandelingen plaatsvindt. Alhoewel sommige biggen kortdurende waterdunne diarree kunnen ontwikkelen, zal de meerderheid van de biggen slechts milde symptomen van E. coli besmetting vertonen (milde diarree / temperatuursverhoging). Biggen worden na inoculatie frequent gecontroleerd (minimaal 2 x daags).

#### E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.



We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde klinische verschijnselen na E. coli inoculatie. De milde klinische verschijnselen die we verwachten zijn diarree, een verminderde voeropname en verminderde activiteit (maar wel alert). Hoewel er een mild pathogene stam van E. coli gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan E. coli ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de E. coli inoculatie daarom goed te controleren wordt de individuele mestconsistentie eenmaal daags bepaald, wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten en worden de biggen minimaal tweemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 5 dagen na inoculatie. De klinische verschijnselen zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven wanneer een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige symptomen, zoals uitdrogingsverschijnselen, niet drinken en niet alert zijn, zal de big meteen uit de proef worden gehaald en worden geëthanaseerd.

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

0-2%

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van E. coli inoculatie, van de bemonsteringen en van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (63% van de dieren). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (37% van de dieren).

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). Ook kunnen deze de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.
Vermindering	De onderzoeksofzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <a href="#">5.1 lid2h</a> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten.

Verfijning	De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.
------------	--

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

#### H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

#### I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

#### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

#### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Biggen die geïnoculeerd zijn, worden aan het einde van de proef opgeofferd in het kader van de proef of na afloop van de proef gedood in het kader van bioveiligheid (voorkomen van verspreiding van de ingezette E. coli op het onderzoeksbedrijf).

Onderzoek van weefsels en organen na euthanasie zal bij onderzoeksvragen naar het werkingsmechanisme van de strategieën, bijdragen aan de interpretatie van de resultaten: bijvoorbeeld het microbioom in verschillende segmenten van de darm is hierbij van belang.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

In het kader van de bioveiligheid en het welzijn van de andere dieren op het onderzoeksbedrijf zullen dieren die in het kader van de proef geïnoculeerd zijn met E. coli geëuthanaseerd worden. Herplaatsing is om deze reden in de opinie van [5.1 lid2h](#) geen goede optie.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
2	Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## Inleiding

Streptococcus suis (S. suis) infectie is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsproblemen bij gespeende biggen. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen de strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en (reeds in de praktijk ingezette) autovaccins. Zoals omschreven in het projectvoorstel, zijn biggen extra gevoelig voor S. suis infecties na het spenen, omdat de afweer van de dieren dan verminderd is door stress van het spenen (o.a. transport stress en verandering in voer), waardoor S. suis makkelijker kan koloniseren. Bovendien ontstaat door de nieuwe groepssamenstelling na het spenen de kans dat een varken besmet met virulente S. suis stam de andere biggen in de groep besmet.

Omdat er uit onderzoek van [5.1 lid2h](#) en de literatuur is gebleken dat S. suis overgedragen kan worden van zeug op big tijdens geboorte en lactatie en tussen biggen onderling zullen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage niet alleen toegepast in het voer voor gespeende biggen, maar kunnen deze ook gegeven worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen. In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op het risico op S. suis kolonisatie. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden. Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën toegepast worden in de praktijk om zo de kolonisatie van S. suis bij gespeende biggen te verminderen, en daarmee het welzijn en de gezondheid van varkens te verbeteren (minder ontstekingen), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica te verminderen. Daarnaast wordt de pathogenese van S. suis tot dusver nog niet volledig begrepen en zal de kennis verworven met proeven in deze bijlage bijdragen om deze beter in kaart te brengen (bijv. rol pariteit zeug, geboorte gewicht biggen).

## Experimentele aanpak

Er is veel diversiteit (verschillende serotypes) binnen S. suis. Niet al deze serotypes worden wereldwijd even vaak aangetroffen en er zijn regionale verschillen in het voorkomen van serotypes. De S. suis stam op [5.1 lid2h](#) is gekarakteriseerd op serotype, zodat het onderzoek uitgevoerd wordt met een voor de praktijk relevante S. suis stam. De afgelopen jaren is uit onderzoek op [5.1 lid2h](#) gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen de tonsil en darm kolonisatie van biggen in de kraamstal beïnvloed kan worden, welke vervolgens een grote rol spelen in gezondheid van biggen na spenen. Naast voeding van zeug en biggen voor spenen, speelt ook de (abrupte) voerovergang op het moment van spenen een rol in het risico op symptomen van S. suis na het spenen, waardoor het belangrijk kan zijn onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom wordt onderzoek gedaan met proefopzetten waarin de voeding van de zeug, de zogende big en/of de gespeende big een rol kan spelen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethodes

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)		
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gespeende biggen		Inoculatie S. suis gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van inoculatie	Hergroeperen / verplaatsen <sup>c</sup> gespeende biggen
1	Ja				Ja	Dag 4	Ja
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4	Ja
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4	Ja
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-21	Ja
5			Ja	Ja	Ja	Dag 4-21	Ja

<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in de kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van inoculatie is afhankelijk van de lengte van de proefvoeradaptatieperiode van het testproduct

<sup>c</sup> Hergroeperen of verplaatsen van de gespeende biggen zodat S. suis zich beter kan koloniseren

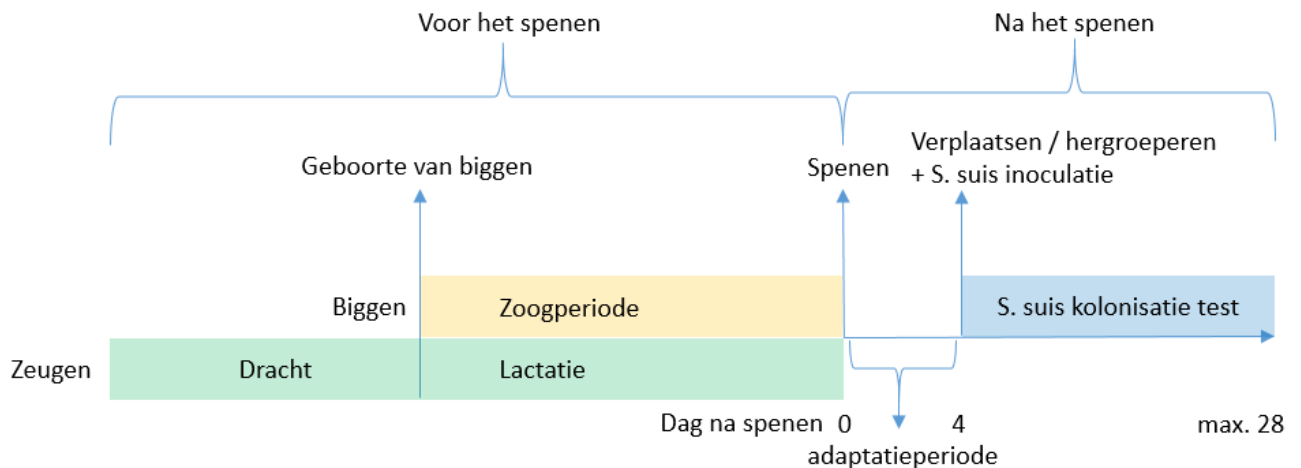
**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op S. suis kolonisatie na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te inoculeren na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab kan worden bekeken of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen.

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnoculeerd worden met S. suis op dag 4 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling

krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnoculeerd kunnen worden met *S. suis*. Het moment van inoculeren is dus flexibel, maar wel altijd tussen 4 en 21 dagen na het spenen.

**Ad c.** Om de *S. suis* beter te laten aanslaan worden de biggen voor inoculatie verplaatst en gehergroepeerd. Zoals in het projectvoorstel is benoemd, is transport een van de factoren die een rol spelen bij het koloniseren van *S. suis*.

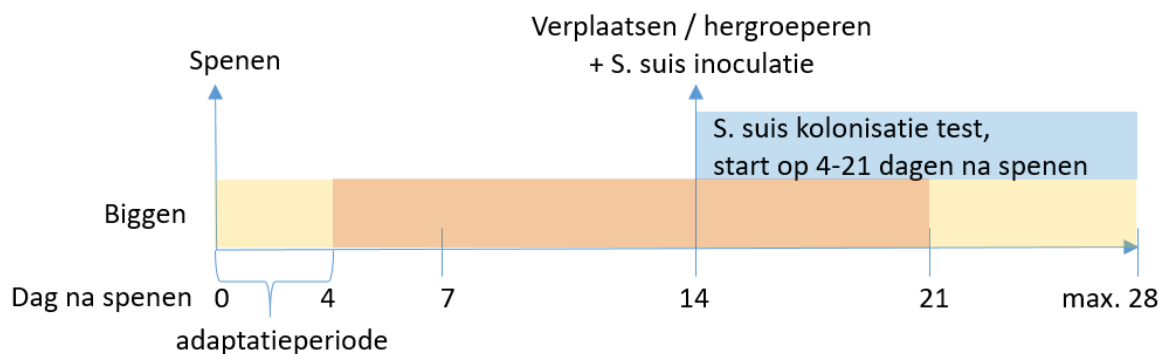
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnoculeerd met *S. suis*.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 3 weken, waarna de biggen geïnoculeerd worden met *S. suis*. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de *S. suis* inoculatie kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



## **Algemeen**

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 3 weken, waardoor de *S. suis* kolonisatie test zal starten op 4-21 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de *S. suis* kolonisatie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### S. suis kolonisatie test (uitscheiding van S. suis bestuderen)

- Verplaatsen / hergroeperen:  
Na de adaptatieperiode wordt een verandering in de fysieke en/of sociale omgeving aangebracht. Bijvoorbeeld door de dieren te verplaatsen van de gespeende biggenstal naar de lab faciliteiten. Dit wordt gedaan om de infectie beter te laten verlopen (Swildens et al., 2004; 5.1 lid2h, 5.1 lid2e), aangezien *S. suis* een korte levensduur heeft en makkelijker kan koloniseren bij een verminderde afweer door stress. Uit voorgaande proeven op 5.1 lid2h blijkt namelijk dat na het verplaatsen en hergroeperen van de biggen *S. suis* zich gemakkelijker kan koloniseren, waardoor de resultaten van de proef verbeterd worden.
- Inoculatie:  
Op dezelfde dag als deze fysieke en/of sociale omgevingsverandering worden de dieren vervolgens oraal en nasaal geïnoculeerd met een mild pathogene stam van *S. suis* bacteriën, waarna de uitscheiding van *S. suis* op de tonsillen bestudeerd zal worden over de tijd. De *S. suis* kolonisatie test eindigt door de dieren te euthanaseren, waarna de kolonisatie van *S. suis* in het ileum bestudeerd zal worden. De dieren worden zowel oraal als nasaal geïnoculeerd, omdat uit onderzoek op 5.1 lid2h is gebleken dat inoculatie via enkel de orale route onvoldoende is om de gewenste besmettingsgraad te bereiken. Er is een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen, omdat als de biggen direct na het spenen geïnoculeerd zouden worden met *S. suis* de resultaten zeer variabel zullen zijn wegens grote variatie in stress geassocieerd met de voerovergang op spenen en wegens grote variatie en lage voeropname de eerste dagen na spenen.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameters in de *S. suis* kolonisatie test zijn:

1. De kolonisatie van *S. suis* op de tonsillen
2. De kolonisatie van *S. suis* in de darminhoud van het ileum

Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte, en medische behandelingen). Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen omtrent de immuunstatus en het tonsil- en darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### S. suis kolonisatie test

#### a. Transport + hergroeperen

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	1 uur
Frequentie:	1 x

Onderbouwing: De dieren worden blootgesteld aan transport en hergroepering om een gestandaardiseerd stress moment in te bouwen waardoor de S. suis bacteriën goed aanslaan. Het is een methode die lijkt op de omstandigheden in de praktijk waarvan bekend is dat ze effect hebben op het verloop van de infectie: voor de proef worden deze op een gestandaardiseerde wijze uitgevoerd.

#### b. Inoculatie:

De inoculatie bestaat uit een combinatie van oraal en nasaal inoculeren. Het orale inoculeren gebeurt met behulp van een spuitje in de bek van het dier. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Het nasale inoculeren gebeurt met behulp van een airbrush, waarbij druppels inoculum in de neus van de biggen gesprayd worden, waarna het inoculum verder ingeademd zal worden door de biggen. De orale en nasale inoculatie vinden gelijktijdig plaats.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 5 minuten
Frequentie:	1 x
Wijze:	Oraal met een spuitje in de bek en nasaal met een airbrush

#### Tonsil swabs

In iedere proef zullen tonsil swabs bij de gespeende biggen genomen worden om de kolonisatie van S. suis op de tonsillen te bestuderen. Verder wordt in iedere proef een afweging gemaakt of er ook tonsil swabs nodig zijn bij de zeugen en biggen in de kraamstal.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 12 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Voor het bestuderen van de kolonisatie van S. suis op de tonsillen zijn tonsil swabs nodig. Naast S. suis bacteriën kan ook het gehele tonsil microbioom op deze manier bestudeerd worden om het werkingsmechanisme beter te begrijpen. Door zowel de zeug en haar biggen te bemonsteren kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

#### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef worden monsters na euthanasie verzameld voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef. Bij methode 1 t/m 4 kan het nodig zijn ook monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit is na S. suis inoculatie noodzakelijk voor het bestuderen van de kolonisatie van S. suis in verschillende organen en weefsels, zoals in de darminhoud van de ileum. Naast het bepalen van de S. suis bacteriën in de darminhoud kan ook het totale darm microbioom bestudeerd worden.

#### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen zijn rectale swabs nodig. Verder wordt in iedere proef een afweging gemaakt of er mestmonsters of rectale swabs verzameld moeten worden bij zeugen en/of biggen om de onderzoeksvraag te beantwoorden. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 8 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en omvat het nemen van

een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Verse mestmonsters kunnen nodig zijn om de uitscheiding van *S. suis* via de mest te bepalen. De analyse op *S. suis* bacteriën laat het niet toe om mestmonsters vanaf de vloer te verzamelen, omdat bacteriën zich vermenigvuldigen na uitscheiding, waardoor er een vertekend beeld kan ontstaan. Een vers mestmonster of rectale swab kan ook gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen. Een rectale swab wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters of rectale swabs bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Bloedmonsters

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er bloedmonsters verzameld moeten worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie, hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

Onderbouwing: Bloedmonsters worden genomen voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, bijvoorbeeld om anti-*S. suis* antilichamen in het bloed van biggen, en zeugen (bijv. voor en na vaccinatie), te meten.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speekselmonsters en neus swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen, of vaginale swabs en biest van de zeugen.

#### Speeksel

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen

Onderbouwing: Ter bepaling van biomarkers voor de gezondheidsstatus, bijvoorbeeld antilichamen, of het bepalen van bacteriën in de mondholte.

#### Neus swab

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 10 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de neus. Dit kan relevant zijn, omdat dit de eerste plek is waar luchtweg microben een barrière tegenkomen.

#### Vaginale swab

Dieren:	Zeugen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 4 x per cyclus

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de vagina. Dit kan relevant zijn, omdat bij de geboorte van biggen de microbiota in het geboortekanaal van de zeug van invloed zijn op de ontwikkeling van de darm microbiota van de big.

#### Biest

Dieren:	Zeugen
Frequentie:	1 x, binnen 24 uur na geboorte van de biggen
Wijze:	Met de hand melken

Onderbouwing: Ter bepaling van anti-*S. suis* antilichamen in de biest.

## Rectale temperatuur

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	2 x daags
Moment:	Eerste 4 dagen na inoculatie

### Onderbouwing:

Als responsparameter is de lichaamstemperatuur momenteel nog niet onderkend als een goede voorspeller / indicator van het ziekteverloop van *S. suis*. Echter, voor monitoring van de gezondheid van de biggen na inoculatie worden de biggen 2 x daags getemperatuur en vaker indien nodig.

### Referenties

Choudhury, R., Middelkoop, A., Bolhuis, J. E., & Kleerebezem, M. 2019. Legitimate and Reliable Determination of the Age-Related Intestinal Microbiome in Young Piglets; Rectal Swabs and Fecal Samples Provide Comparable Insights. *Frontiers in microbiology* 10, 1886.

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

Swildens B, Stockhofe-Zurwieden N, van der Meulen J, Wisselink HJ, Nielen M and Niewold TA (2004) Intestinal translocation of *Streptococcus suis* type 2 EF+ in pigs. *Vet Microbiol* 103, 29– 33.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse worden gegevens uit eerdere proeven op 5.1 lid2h of uit de literatuur gebruikt. Uit onze eerdere onderzoeken is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van *S. suis*. Het exacte aantal zeugen en biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	180	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	240	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	600	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van 5.1 lid2h
Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op <i>S. suis</i> besmetting bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari-december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.

Aantal	<p><u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u>  3 proeven in 5 jaar, 2-8 behandelingen per proef, 10-15 zeugen per behandeling.  Gemiddeld 3 proeven x 6 behandelingen x 10 zeugen = 180 zeugen.</p> <p><u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u>  1-3 proeven per jaar, 3-7 behandelingen per proef, 6-17 biggen per behandeling.  2 proeven x 6 behandelingen x 14 dieren = 168 biggen x 5 jaar = 840 biggen.  Hiervan worden 600 biggen (zowel voor als) na spenen ingezet (2 proeven per jaar x 6 behandelingen x 10 dieren = 120 biggen x 5 jaar = 600 biggen). De andere 240 biggen worden alleen tot spenen gevolgd om biggen te kunnen selecteren die voldoende vast voer hebben opgenomen in de kraamstal.</p>
Geslacht	<p>Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek.</p> <p>Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.</p>
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

### C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op het risico voor S. suis infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018).

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten, of in de gespeende biggenstal (in groepen van 6 biggen per hok) van 5.1 lid2h waarna ze vóór S. suis inoculatie naar de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) zullen verhuizen. De S. suis kolonisatie test vindt dus altijd plaats in de lab faciliteiten. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur.

De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voordoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, het minimale bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de S. suis bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van twee niet-eetbare speeltjes, waarvan één dagelijks wordt gewisseld met een ander speeltje.

#### Referenties

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.  
Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluijvers-Pooldt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, inoculatie met *S. suis*, tonsil swabs, bloedafname, mestmonsters). Ook fixatie (voor inoculatie en bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens. De gespeende biggen worden ook blootgesteld worden aan transport, verplaatsen en/of hergroeperen om kolonisatie van *S. suis* te faciliteren.
- De *S. suis* kolonisatie test zal leiden tot milde tot matige ziekteverschijnselen, zoals een kortdurende verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte gewrichtsontsteking. We verwachten op basis van voorgaande proeven geen toename in medische behandelingen of uitval.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen, transport, verplaatsen). Sociale interacties kunnen toenemen als gevolg van nieuwe hokgenoten, wat tijdelijk enige agressie zal oproepen wegens het bepalen van een nieuwe dominantie hiërarchie.
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de *S. suis* inoculatie.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat veel ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren van de dieren tot minder onrust leidt. Het inoculeren gebeurt door middel van een spuitje in de bek en spray in de neus. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt.
- Er wordt gebruik gemaakt van een mild pathogene stam van *S. suis* bacteriën waardoor ernstige ziekteverschijnselen voorkomen worden. Uit welzijnsevaluaties van eerdere proeven verwachten we geen toename in uitval en het aantal medisch behandelde dieren.

## E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.



We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen na *S. suis* inoculatie. De milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn een verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte gewrichtsontsteking. Hoewel er een mild pathogene stam van *S. suis* gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan *S. suis* ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de *S. suis* inoculatie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten voor 4 dagen na *S. suis* inoculatie en worden de biggen minimaal tweemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 4 dagen na inoculatie. De klinische verschijnselen zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven wanneer een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige symptomen (wanneer gewrichts- of eventueel hersenvliesontsteking onverwacht ernstig optreden) zal de big meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.

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

0-3 %

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van *S. suis* inoculatie, van de bemonsteringen en van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (59% van de dieren). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (41% van de dieren).

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op <i>S. suis</i> kolonisatie is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door <i>S. suis</i> . Dit is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsprobleem bij gespeende biggen. De microbiom kolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de <i>S. suis</i> bacteriën). Ook kunnen deze de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met <i>S. suis</i> niet vervangen.
Vermindering	De onderzoekopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <a href="#">5.1 lid2h</a> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in tonsil/neus/ rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de <i>S. suis</i> afweer test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen <i>S. suis</i> inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met <i>S. suis</i> geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden <i>S. suis</i> op de tonsillen hebben dan biggen die wel met <i>S. suis</i> geïnoculeerd worden. In de huidige proeven geeft zo'n blanco groep daarom geen additionele informatie meer en is de test zodanig opgezet dat met een negatieve en positieve controle volstaan kan worden.

Verfijning	De S. suis kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van S. Suis bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De S. suis bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten en nasaal in de neus van de big gesprayd. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Op de dag van euthanasie worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om de onrust voor de dieren zo minimaal mogelijk te houden. Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in tonsil/neus/rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.
------------	--

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

#### H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

#### I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

#### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

---

**K. Bestemming van de dieren bij einde experiment**

---

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De gespeende biggen die geïnoculeerd zijn met S. suis worden gedood in het kader van de proef om de kolonisatie van S. suis na inoculatie in verschillende organen te bepalen.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.

---



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
3	Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## **Achtergrond**

Na het spenen zijn biggen extra gevoelig voor infectieuze ziektes, omdat de verandering van voeding (van melk naar vast voer) en omgeving vaak leidt tot een onregelmatiger eetpatroon / onvoldoende voeropname. Dit kan leiden tot een (steriele) ontsteking van de darm en oxidatieve stress. Hierbij speelt ook een rol dat het maag-darmkanaal en het immuunsysteem van biggen nog niet volledig ontwikkeld is. Biggen zijn daarnaast gevoeliger omdat zij na het spenen niet meer beschermd worden door passieve immuniteit van de zeug. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op de immuun competentie van gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen de strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en in de praktijk ingezette vaccins.

De voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage zullen niet alleen toegepast worden in het voer voor gespeende biggen. Deze kunnen ook gegeven worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen, omdat uit de literatuur is gebleken dat deze de ontwikkeling van het immuunsysteem van biggen en de (latere) immunrespons kunnen beïnvloeden.

In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op de immuun competentie van biggen. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden (zo kan bijvoorbeeld het gevoerde niveau aan antioxidanten op de minimumbehoefte-norm ingesteld worden). Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën toegepast worden in de praktijk om zo de immuun competentie, en daarmee het welzijn, van varkens te verbeteren (minder ziekte en sterfte), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica en zink te verminderen.

## **Experimentele aanpak**

De afgelopen jaren is uit onderzoek in de literatuur gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen (Bass et al., 2012; Luo et al., 2020) en zogende biggen (de Vries et al., 2020) de ontwikkeling van het immuunsysteem van biggen en de (latere) immunrespons beïnvloed kan worden. De voerovergang bij spenen speelt bovendien een belangrijke rol in de darmmorfologie en -integriteit na het spenen, waardoor het belangrijk is onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom zijn in deze vervolgaanvraag ook zeugen en zogende biggen opgenomen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethodes

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)	
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gespeende biggen		Tweemaal LPS injectie (tussentijd 2 weken) gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van eerste LPS injectie
1	Ja				Ja	Dag 4
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-14
5			Ja	Ja	Ja	Dag 4-14

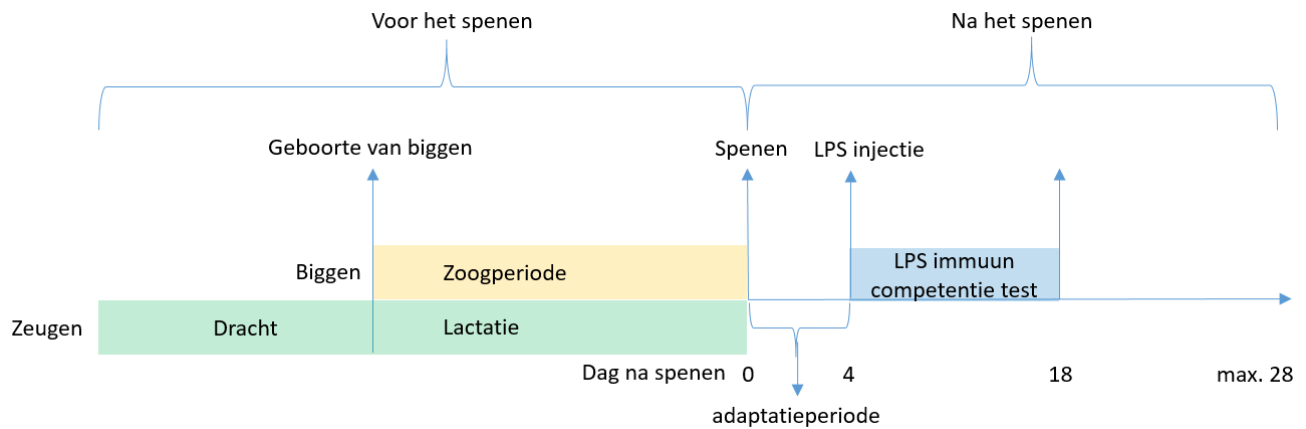
<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van de eerste injectie met LPS is afhankelijk van de lengte van de proefvoeraadaptatieperiode van het testproduct

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op de reactie van het immuunsysteem na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te injecteren met LPS na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab kan worden bekeken of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen.

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnjecteerd worden met LPS op dag 4 en dag 18 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnjecteerd kunnen worden met LPS. Het moment van injecteren is dus flexibel, maar de eerste injectie is wel altijd tussen 4 en 14 dagen na het spenen.

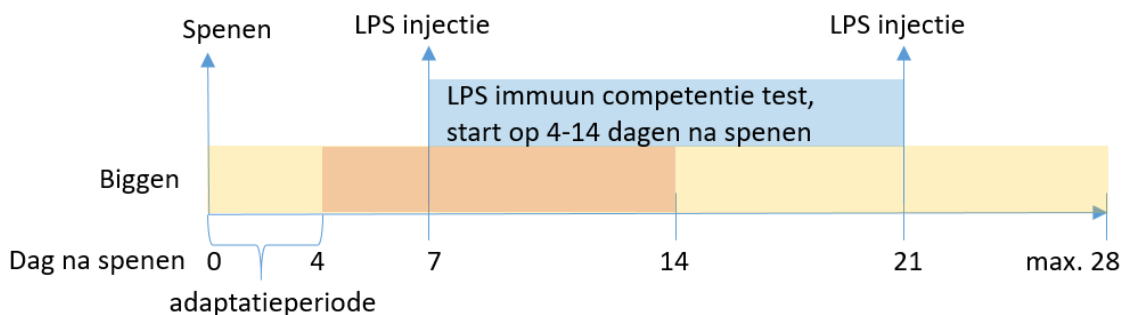
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnjecteerd met LPS.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen, worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen oefenen. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waarna de biggen voor het eerst geïnjecteerd worden met LPS.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet bij methoden waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de LPS immunocompetentie test kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

## Algemeen

### Adaptatie- en proefvoerderperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoerderperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen oefenen. De lengte van de proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waardoor de LPS immunocompetentie test zal starten op 4-14 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de LPS immunocompetentie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.



### LPS immuun competentie test (bestuderen van ontsteking en oxidatieve stress)

De LPS immuun competentie test omvat het intramusculair injecteren van gespeende biggen met zuiver LPS in een lage dosering, waarna op 1,5 en 3 uur na injectie een bloedmonster genomen zal worden om biomarkers voor ontsteking, namelijk cytokines en acutefase-eiwitten, en eventueel biomarkers voor oxidatieve stress te meten. Wanneer zuiver LPS wordt geïnjecteerd, dus zonder andere bacterie deeltjes, wordt een ontstekingsreactie opgeroepen, die snel weer verdwijnt. De effecten van een LPS injectie houden namelijk ongeveer 4 uur aan, waarna het dier herstelt. De ontstekingsreactie resulteert in een verhoging van de lichaamstemperatuur, welke gemonitord zal worden na injectie. Na twee weken krijgen de dieren nogmaals een gelijke dosis LPS intramusculair toegediend. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via *E. coli* bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de response te uniformeren en de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. 5.1 lid1c

(5.1 lid2h, 5.1 lid2e). Ook na de tweede injectie met LPS wordt op 1,5 en 3 uur na injectie een bloedmonster genomen.

Als controle voor de LPS immuun competentie test kan een proefgroep geïnjecteerd worden met Phosphate Buffered Saline (PBS), een verdunningsmiddel dat neutraal is voor het dier. Hierdoor kan het effect van het handelen van het dier en de injectie worden vergeleken met de daadwerkelijke respons op LPS in relatie met de voerstrategie.

Omdat in de praktijk de biggen het meest gevoelig zijn in de eerste twee weken na spenen (van 4 tot 6 weken leeftijd, zie uitleg in projectvoorstel), start de LPS immuun competentie test binnen deze leeftijds categorie. Dit is van belang omdat er geen passieve immuniteit van de zeug meer is en het immuunsysteem en maagdarmkanaal met darmmicrobioom van de biggen op die leeftijd nog volop in ontwikkeling is, en leeftijd daarom een belangrijke rol speelt in de effecten die gevonden zullen worden. De dieren in de proef zijn dan wat betreft ontwikkelingsstadium zoveel mogelijk gelijk zijn aan de dieren onder praktijkomstandigheden.

### **Uitkomstparameters**

De primaire uitkomstparameters in de LPS immuun competentie test zijn:

1. Cytokines
2. Acutefase-eiwitten
3. Rectale temperatuur
4. Biomarkers voor oxidatieve stress
5. Lever enzymen

Aanvullend kan ook de activiteit van het dier gescoord worden. Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte en medische behandelingen). Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen om trent de immuunstatus, antioxidant status en het darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

### Referenties

- Bass, Benjamin Edward. 2012. Influence of Nutritional Modifications on Sow, Litter, and Nursery Performance. Theses and Dissertations.
- Luo, W., Xy, W., Zhang, J., Yao, J. and Xu, J. 2020. The Maternal Diet with Fish Oil Might Decrease the Oxidative Stress and Inflammatory Response in Sows, but Increase the Susceptibility to Inflammatory Stimulation in their offspring. *Animals* 10, 1455.
- De Vries, H., M. Geervliet, C.A. Jansen, V.P.M.G. Rutten, H. van Hees, N. Groothuis et al. 2020. Impact of Yeast-Derived  $\beta$ -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. *Microorganisms* 8, 1573

5.1 lid2h

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### LPS immuun competentie test

De LPS immuun competentie test start door een bekende, lage dosis van LPS intramusculair in het varken te injecteren. Twee weken later wordt een gelijke dosis opnieuw intramusculair geïnjecteerd.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 1 minuut
Frequentie:	2 injecties met een tussenperiode van 2 weken
Wijze:	Intramusculaire injectie

Onderbouwing: De dieren worden tweemaal geïnjecteerd om de individuele variatie te verkleinen. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. [5.1 lid1c](#)

5.1 lid2h, 5.1 lid2

### Bloedmonsters

In iedere proef worden bloedmonsters genomen bij gespeende biggen op 1,5 en 3 uur na de twee LPS (of PBS) injecties. Verder wordt er in iedere proef een afweging gemaakt of er aanvullende bloedmonsters nodig zijn bij de biggen en/of zeugen om de onderzoeksvraag te beantwoorden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 3 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 10 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie (rekening houdend met de korte duur tussen de bloedafname momenten na de injecties), hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

Onderbouwing: Bloedmonsters worden op 1,5 en 3 uur na de twee LPS (of PBS) injecties genomen om cytokines en acute-fase eiwitten te meten, dus in totaal 4 bloedmonsters. Daarnaast wordt in iedere proef een afweging gemaakt of ook op latere tijdstippen na injectie, bijvoorbeeld op 6, 12 of 24 uur na injectie bloed afgenomen zal worden, omdat sommige acute fase eiwitten later opkomen (Llamas Moya et al., 2006). Bloedmonsters kunnen ook o.a. gebruikt worden om de antioxidant status te bepalen. Daarnaast kunnen aanvullend bloedmonsters genomen worden bij biggen en/of zeugen om de effectiviteit van de voeradditieven en voer(productie)strategieën op het basale niveau (zonder immuun activatie) van de immuun parameters te bestuderen.

### Rectale temperatuur

In iedere proef wordt de rectale temperatuur van de gespeende biggen gemeten voorafgaand aan de LPS (of PBS) injecties, en maximaal 5 x na de injectie.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 12 x
Moment:	1 x voorafgaand aan injectie en maximaal 5 x binnen 24 uur na injectie

Onderbouwing: De rectale temperatuur wordt gemeten om de ontstekingsrespons in kaart te brengen.

### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen en eventuele aanvullende parameters zijn verse mestmonsters of rectale swabs nodig. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden. In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er mestmonsters verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 8 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en om vat het nemen van

een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Verse mestmonsters kunnen nodig zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, bijvoorbeeld voor het bepalen van de antioxidant status middels TAC (total antioxidant capacity) of voor het bepalen van biomarkers voor ontsteking zoals TPO (total peroxidase activity). Wanneer de analyse het toelaat zullen mestmonsters vanaf de vloer verzameld worden, waardoor rectale stimulatie niet nodig is. Wanneer het darmmicrobioom een rol speelt in het werkingsmechanisme, bijvoorbeeld bij probiotica, kan ook een rectale swab gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen. Dit wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters of rectale swabs bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of en wanneer er monsters na euthanasie verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef. Bij methode 1 t/m 4 kan het nodig zijn ook monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit kan noodzakelijk zijn om bijvoorbeeld de lokale immuunrespons in de darmwand (bijv. door middel van genexpressie), het microbioom in de darm, en darm morfologie en -integriteit te onderzoeken of de antioxidant status in organen.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speekselmonsters of tonsil swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen.

#### Speekselmonster

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen

Onderbouwing: Speekselmonsters kunnen nodig zijn om het werkingsmechanisme van de voerstrategie te bestuderen. In het speeksel kunnen biomarkers voor de gezondheidsstatus, bijvoorbeeld antilichamen zoals sIgA, en biomarkers voor oxidatieve stress bepaald worden.

#### Tonsil swab

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Tonsil swabs kunnen in enkele gevallen, bijvoorbeeld bij onderzoek naar probiotica, ingezet worden om de relatie tussen de darm microbiota en tonsil microbiota te onderzoeken. Onderzoek van het microbioom van de tonsillen is daarom incidenteel informatief in dit type onderzoek.

### Referenties

Llamas Moya, S., Boyle, L., Lynch, P., Arkins, S. 2006. Pro-inflammatory cytokine and acute phase protein responses to low-dose lipopolysaccharide (LPS) challenge in pigs. *Animal Science* 82: 527–534.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse worden gegevens uit eerdere proeven op 5.1 lid2h of uit de literatuur gebruikt. Uit onze eerdere onderzoeken is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in acute fase-eiwitten en cytokines. Het exacte aantal zeugen en biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	120	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	150	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	360	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van <a href="#">5.1 lid2h</a> .
Levensstadia	<p>In dit onderzoek worden zeugen (pariteit <math>\geq 1</math>) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op de immuun-competentie bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).</p> <p><u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari -december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.</p>
Aantal	<p><u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u> 2 proeven in 5 jaar, 2-8 behandelingen per proef, 10-15 zeugen per behandeling. Gemiddeld 2 proeven x 6 behandelingen x 10 zeugen = 120 zeugen.</p> <p><u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u> 1 proef per jaar, 3-10 behandelingen per proef, 6-17 biggen per behandeling. 1 proef x 6 behandelingen x 17 dieren = 202 biggen x 5 jaar = 510 biggen. Hiervan worden 360 biggen (zowel voor als) na spenen ingezet (1 proef per jaar x 6 behandelingen x 12 dieren = 72 biggen x 5 jaar = 360 biggen). De andere 150 biggen worden alleen tot spenen gevolgd om biggen te kunnen selecteren die voldoende vast voer hebben opgenomen in de kraamstal.</p>
Geslacht	<p>Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek. Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.</p>
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

## C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van <sup>5.1 lid2h</sup> 5.1 lid2h. In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten). Vanwege het bestuderen van voeradditieven en voer(productie)strategieën, waarbij voeropname een belangrijke read-out parameter is, is het niet altijd mogelijk om de gespeende biggen te voorzien van eetbare hokverrijking (zoals strooisel), omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De dieren worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingmaterialen.

#### Referenties

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.  
Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluijvers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De biggen kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens het injecteren van LPS (of PBS) en tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, toedienen van injecties, bloedafname, rectale temperatuur). Ook fixatie (voor bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens.
- Verwacht wordt dat de dieren kortdurende milde tot matige ziekteverschijnselen zullen ontwikkelen na de LPS injecties, zoals een verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur op de dag van de LPS injectie (0.9-1.3°C verhoging t.o.v. negatieve controle met PBS injectie). Verwacht wordt dat deze klinische verschijnselen tot 4 uur na de LPS injectie aanhouden, waarna het dier herstelt en de voeropname weer op gang komt. We verwachten op basis van voorgaande proeven geen toename in medische behandelingen of uitval.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen).
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de LPS injecties.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat geruime ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren van de dieren tot minder onrust leidt.
- Alvorens de 1<sup>e</sup> LPS injectie toegediend zal worden aan gespeende biggen, vindt er eerst een adaptatieperiode plaats. Het spenen van biggen kan namelijk stressvol ervaren worden door de gelijktijdige veranderingen die optreden in voer en (sociale) omgeving. Door een adaptatieperiode in te lassen, vindt het toedienen van LPS plaats op een moment welke minder stressvol is voor de biggen. Hierdoor wordt het risico op ongerief beperkt. Bovendien is dit ook noodzakelijk voor de proefopzet, omdat als de LPS immuun competentie test direct na spenen uitgevoerd zal worden, de resultaten meer variatie kunnen vertonen wegens individuele verschillen voor wat betreft stress geassocieerd met spenen tussen de dieren.
- We gebruiken een lage LPS dosering. Op basis van eerdere proeven verwachten we geen ernstige ziekteverschijnselen en geen toename in uitval en het aantal medisch behandelde dieren.

## E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In principe wordt er geen humaan eindpunt verwacht.

We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen vanaf ongeveer 30 minuten na LPS injectie tot 4 uur na LPS injectie. De kortdurende milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur. Hoewel er een lage dosering van LPS gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de LPS injectie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen gemeten op de dag van en de dag na de LPS injectie en worden de biggen driemaal binnen 24u na de LPS injectie gecontroleerd op klinische verschijnselen. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.

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

0-1 %



## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van de LPS injecties (gevolgd door immuun activatie), van de bemonsteringen en in sommige proeven van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (57% van de dieren). Het ongerief is licht voor de biggen met de PBS injecties (dieren in de controle behandeling). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (43% van de dieren).

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te doen over het effect van voer(productie)strategieën en voeradditieven bij zeugen en hun biggen op de immuun competentie van gespeende biggen is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door ziekteverwekkers. Het afweersysteem van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben, welke een belangrijke rol spelen in de immuun competentie. Ook kunnen deze de relatie tussen voeding van de zeug en latere afweerreactie van biggen niet vervangen.
Vermindering	De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op 5.1 lid2h en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.
Verfijning	De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via <i>E. coli</i> bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

---

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

---

## I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

---

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

---

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

---

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Euthanasie zal naar schatting plaatsvinden in 60% van de ingezette biggen na het spenen, en daarom naar schatting worden uitgevoerd in maximaal 216 biggen over 5 jaar (60% van 360). Het euthanaseren zal, bij onderzoeksvragen naar het werkingsmechanisme van de strategieën, bijdragen aan de interpretatie van de resultaten. Op basis van de beschikbare informatie over de strategieën zal worden bepaald of een subset van de varkens geëuthanaseerd zal worden in het kader van de proef, bijvoorbeeld om de concentratie van antioxidant in lever en spieren te beoordelen, of de lokale immuunrespons in de darmwand en darmmorfologie en -integriteit te onderzoeken.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

---

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

---

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.

Naam van het project	Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-339777 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	varken gezondheid voer afweersysteem infectie
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren

## DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Jonge biggen zijn zeer gevoelig voor ziekte. Met name diarree door E. coli bacteriën en ontstekingen door Streptokokken bacteriën komen bij biggen regelmatig voor. Vooral in de periode rondom het spenen is het belangrijk om de gezondheid van de big extra te ondersteunen. Daarnaast kan de gezondheid en weerbaarheid van biggen verbeterd worden door de gezondheid van de zeug rondom de geboorte van haar biggen te optimaliseren. Het afweersysteem van biggen is namelijk na geboorte nog volop in ontwikkeling en onder andere de melk van de zeug speelt een grote rol in de afweer van de biggen. In dit project worden daarom voerstrategieën bij zeugen en hun biggen getest om de algemene weerstand van de biggen te verbeteren en om de weerbaarheid van biggen tegen met name de genoemde infectieuze ziekten te ondersteunen. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan voerstrategieën die de populatie van darmbacteriën positief beïnvloeden zodat ziekteverwekkers minder de kans krijgen om ziekte te veroorzaken. Door gespeende biggen bloot te stellen aan een milde vorm van één van deze ziekteverwekkers kan het effect van verschillende voerstrategieën op de gezondheid en weerstand van de biggen vastgesteld worden aan de hand van mestmonsters, bloedmonsters, swabs van keelamandelen en soms darminhoud en weefsel.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	De directe doelstelling is het ontwikkelen van voerstrategieën die de gezondheid ondersteunen bij specifieke ziekteverwerkers of die de algemene gezondheid / weerstand van biggen bevorderen. Door met voeding te sturen, wordt op deze wijze de kans dat varkens ziek worden kleiner. Daardoor wordt diergezondheid en dierenwelzijn verbeterd. Het uiteindelijke doel is verlaging van het gebruik van antibiotica en mineralen (welke nu in hoge doseringen worden ingezet om bacteriën te remmen). Hiermee wordt de volksgezondheid en de bodem- en waterkwaliteit bevorderd.

## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Om effecten op gezondheid bij specifieke ziekteverwekkers of de algemene gezondheid van gespeende biggen te testen, zullen de dieren eenmalig een milde vorm van de ziekteverwekker toegediend krijgen (oraal en soms gelijktijdig ook nasaal) of zal het afweersysteem geactiveerd worden door middel van injectie met een stofje dat ook bij ontstekingsreacties kan vrijkomen. Daarnaast zullen zeugen en biggen bemonsterd worden door het nemen van bloedmonsters (max. 10 x), mestmonsters (max. 15 x) of swabs van de keelamandelen (max. 12 x). Zo kan de reactie van de biggen voor wat betreft de activatie van het afweersysteem en de vermeerdering van de ziekteverwekker worden onderzocht bij verschillende voerstrategieën. De handelingen duren maximaal 5 minuten.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Na toediening van de (milde) ziekteverwekker of activatie van het afweersysteem kunnen de gespeende varkens zich in algemene zin ziek voelen gedurende een beperkte periode (uren tot een paar dagen). Ze zijn dan minder actief (wel alert) en eten minder en ze kunnen koorts of diarree krijgen. Het nemen van swabs en mestmonsters zal hooguit lichte stress opleveren. Het afnemen van bloedmonsters kan kortdurend lichte pijn en stress opleveren.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>3090</td> <td>0</td> <td>1230</td> <td>1860</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	3090	0	1230	1860	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	3090	0	1230	1860	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>480</td> <td>894</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	480	894	0					
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	480	894	0														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Ruim de helft van de ingezette dieren wordt gedood in het kader van de proef. Dit zijn biggen waarvan de effecten op organen en de bacteriegroei in darminhoud en weefsels worden onderzocht of waarbij moet worden voorkomen dat zij de ingezette ziekteverwekker overdragen naar de andere dieren op het bedrijf. De zeugen, en ook biggen die bemonsterd maar niet besmet worden, blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden. Zeugen krijgen meerdere keren biggen in hun leven en kunnen daarom later opnieuw in onderzoek worden ingezet.</p>																

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De voerstrategieën die in het project worden getest, zijn in een eerdere fase in het laboratorium getest (bijv. door middel van stimulatie van immuun- of darmwandcellen van varkens), met een positief resultaat. De laatste stap is om deze supplementen te testen bij de varkens zelf. Omdat het lichaam van een varken een complex systeem is, is het niet precies te voorspellen of de effecten die gevonden zijn in het laboratorium ook daadwerkelijk hetzelfde zijn bij het dier. Daarnaast kan het immuunsysteem leren van eerdere infecties, waardoor effecten in de tijd kunnen veranderen. Dit proces kan alleen in het dier zelf gevolgd worden.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Het benodigde aantal dieren wordt met statistische modellen berekend en hierdoor wordt gewerkt met het minimaal benodigde aantal dieren. Wanneer meerdere genomen monsters van 1 dier met elkaar vergeleken kunnen worden, en het dier daardoor zijn eigen controle kan vormen, zal dit worden gedaan. Op deze manier kan het aantal bemonsteringen en/of aantal dieren verminderd worden.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Na blootstelling aan de (milde) ziekteverwekker of activatie van het immuunsysteem worden de gespeende biggen nauwlettend gecontroleerd op ziekteverschijnselen en lichaamstemperatuur.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij gespeende biggen is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door ziekteverwekkers. Het afweersysteem van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloed worden, waardoor het ook zeer zinvol is om voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 25 februari 2021 09:08  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588  
**Bijlagen:** AVD 5.1 lid2h\_Bijlage2\_preventie\_S.suis.docx; AVD 5.1 lid2h\_Aanvraag\_projectvergunning\_ziektepreventie\_big.pdf; AVD 5.1 lid2h\_NTS\_ziektepreventie\_big\_kopie.xlsx; AVD 5.1 lid2h\_Bijlage1\_preventie\_E.coli.docx; AVD 5.1 lid2h\_Bijlage3\_Immuuncompetentie.docx; AVD 5.1 lid2h\_Projectvoorstel\_ziektepreventie\_big.docx

Geachte leden van DEC 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen." en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202114588.

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 25-02-2021, 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 25-02-2021 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

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

---

**Van:** 5.1 lid2h  
**Verzonden:** vrijdag 14 mei 2021 14:07  
**Aan:** 'info@zbo-ccd.nl'  
**Onderwerp:** Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588  
**Bijlagen:** Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588.pdf; AVD 5.1 lid2h 202114588\_Bijlage1\_preventie\_E.coli\_v2.docx; AVD 5.1 lid2h 202114588\_Bijlage2\_preventie\_S.suis\_v2.docx; AVD 5.1 lid2h 202114588\_Bijlage3\_Immuuncompetentie\_v2.docx; AVD 5.1 lid2h 202114588\_Projectvoorstel\_ziektepreventie\_big\_v2.docx

**Categorieën:** DEC adviezen

Goedemiddag,

In de bijlage vindt u het advies van DEC 5.1 lid2h voor projectaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588, inclusief de bijgewerkte documenten van de aanvraag.

Verder heb ik een vraag meer procedurele aard hierbij: we hebben na de eerste bespreking van deze aanvraag behoorlijk gewikt en gewogen: gingen we (heel veel) vragen stellen aan de onderzoeker, of zouden we de aanvraag direct aan jullie teruggeven als 'niet beoordeelbaar' vanwege het grote aantal onduidelijkheden? We hebben uiteindelijk voor de eerste optie gekozen. Ik ben als secretaris benieuwd hoe de CCD hier naar kijkt; kunnen jullie je vinden in de gekozen werkwijze, of zouden jullie adviseren een volgende keer de vragen niet aan de onderzoeker te stellen maar de aanvraag terug te geven aan de CCD als 'niet beoordeelbaar', met vermelding van de knelpunten?

Ik hoor graag hoe hier 'aan jullie kant' over gedacht wordt, uiteraard ben ik ook meer dan bereid hier eens met een van jullie over te spreken, mocht een schriftelijke reactie lastig zijn.

Hartelijke groet,<sup>s</sup>  
[Redacted]

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202114588
2. Titel van het project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen
3. Titel van de NTS: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
<sup>5.1 lid2h</sup>  
 Secretaris: <sup>5.1 lid2h</sup>
6. Adviestraject  
 Ontvangen door DEC: 25-2-2021  
 Aanvraag compleet: ja  
 In vergadering besproken: 8-3-2021 en 10-5-2021  
 Anderszins behandeld: n.v.t.  
 Termijnonderbreking(en): 13-4-2021 t/m 29-4-2021  
 Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.  
 Aanpassing aanvraag: n.v.t.  
 Advies aan CCD: 14-5-2021
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  
 Vragen: 17-3-2021  
 Antwoorden: 10-5-2021

Geachte leden van de DEC,

Op 17-03-2021 hebben wij uw email ontvangen betreffende het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen' met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202114588. Bij deze ontvangt u antwoorden op de door u gestelde vragen m.b.t. dit project.

In verband met de samenhang van antwoorden op diverse vragen, hebben wij ervoor gekozen om sommige vragen samen te nemen, omdat de antwoordrichtingen hetzelfde zijn. Dit gaat om vraag a + i, c + e, en b + d + g. Er is daarom enige afwijking in de volgorde van de vragen en hun antwoorden. Aanpassingen in het projectvoorstel en de bijlagen zijn zichtbaar gemaakt met een **blauwe** tekstkleur.

a. Op basis waarvan wordt de keuze van de additieven gemaakt, en hoe wordt voorkennis (bekend onderzoek) en/of een (in vitro) voorstudie hierbij betrokken?

i. Hoe wordt voorkomen dat een groot aantal stoffen wordt getest, en dus een groot aantal dieren wordt gebruikt, zonder dat het doel wordt gehaald (en dus zonder opbrengst voor het doeldier)?

*De strategie begint met het uitgebreid verzamelen van informatie over de achtergrond en het werkingsmechanisme van het voeradditief. Dit is verduidelijkt onder '3.4.1. Strategie' in het projectvoorstel. Deze informatie wordt gezocht in de literatuur, gebaseerd op kennis en ervaring binnen <sup>5.1 lid2h</sup>, en gebaseerd op informatie, zoals onderzoek, van de toeleverancier. Het onderzoeksteam is betrokken bij EU- en <sup>5.1 lid2h</sup> op het gebied van voeding in relatie tot E. coli en S. suis bij varkens, waardoor het team op de hoogte is van de meest recente ontwikkelingen op dit onderzoeksgebied. Het doel van deze zogenaamde "voorstudie" is om antwoorden te vinden op de vragen van het selectieproces: zie vragen onder 3.4.1 in het projectvoorstel. Dit selectieproces zorgt ervoor dat alleen voedingsinterventies ingezet worden in het onderzoek onder dit project wanneer het additief in vitro, of voor andere doelstellingen of bij andere diersoorten getest is met positief resultaat.*

Hieronder zal puntsgewijs, in meer detail, uitgelegd worden wat dit inhoudt. Het doel van deze voorstudie en de check op criteria waaraan additieven en strategieën moeten voldoen, is tevens van belang om duplicatie te voorkomen.

Positief resultaat bij:

In vitro onderzoek, zoals bijvoorbeeld:

o villus adhesie test: percentage remming van de binding van *E. coli* aan darmcellen  
o stimulatie van immuun- of darmwandcellen (zoals in darm organoïden) van varkens met LPS

o bepalen van de Minimum Inhibitory Concentration (MIC, groeiremming) en Minimum Bactericidal Concentration (MBC, afdoding) waarden: een maat voor de antimicrobiële activiteit van het additief. Met de MIC en MBC vanuit in vitro testen kan de bacteriedodende werking tegen *E. coli* en *S. suis* bepaald worden.

Onderzoek v.w.b. andere doelstellingen. Zo kan het gaan om voeradditieven die geregistreerd zijn als zoötechnische voeradditieven en welke dus een positief effect vonden op de prestaties van de dieren, maar waarbij op basis van het werkingsmechanisme ook een effect op *E. coli*, *S. suis* of het moduleren van het immuunsysteem wordt verwacht.

Onderzoek bij andere diersoorten. Zo kan het gaan om een voeradditief dat bij vleeskuikens bijvoorbeeld een positief effect heeft laten zien op de darmgezondheid.

Bij positief resultaat van het voeradditief, wordt gecontroleerd of de kennis die met de proef verkregen zou worden op Nederlands en Europees niveau kan worden toegepast. Het doel van dit project is tenslotte om tot voer-oplossingen te komen die in de praktijk gebruikt kunnen worden. Hierbij heeft het bijvoorbeeld geen zin om gehalten te testen die niet in de praktijk gebruikt zullen worden, omdat dit bijvoorbeeld kostentechnisch niet haalbaar is.

Indien de voeradditieven of strategieën vervolgens worden ingezet in proeven wordt een zorgvuldig getest model gebruikt. De modellen worden uitgevoerd met een voor de praktijk relevante *E. coli* of *S. suis* stam. Hierdoor wordt gewaarborgd dat grote stappen gemaakt kunnen worden bij bevestiging van de effectiviteit van het additief of de voerstrategie.

Samenvattend: de fasering in de strategie zorgt ervoor dat alleen relevante voeradditieven getest zullen worden in het doeldier. De eerste stap van de strategie is een voorstudie en het beantwoorden van een aantal selecterende vragen over het voeradditief of de voerstrategie, waaronder de mogelijkheid om een product of strategie toepasbaar te kunnen maken voor de praktijk.

c. Is er een andere manier om tot een relevant resultaat te komen? De DEC ziet bijvoorbeeld mogelijkheden om in een in vitro voorstudie te kijken naar effecten van additieven op het microbioom. Ook de (on)mogelijkheid om de gewenste voeding-effecten op het microbioom in observationele studies, zonder experimentele infectie-interventies, te bepalen is onderbelicht. e. Het is de bedoeling om met een voeroplossing te bereiken dat biggen beter bestand zijn tegen genoemde frequent voorkomende infecties. Onderzoek naar de invloed van voeding op het infectierisico (dus niet ziekterisico) van deze algemeen voorkomende bacteriën van deze genera kan met minimaal ongerief (nemen swabs) geschieden en eist mogelijk niet eens een ethische toetsing. Waarom wordt deze optie niet opgevoerd?

In het antwoord hierboven hebben wij nadere toelichting gegeven over de fasering van de strategie, en de rol van in vitro onderzoek hierin. Om het doel van deze projectaanvraag te bereiken, kan echter niet worden volstaan met uitsluitend in vitro onderzoek. In vivo bestaat de darm uit een complex systeem van epitheelcellen, immuuncellen en componenten van het perifere zenuwstelsel. In in vitro onderzoek ontbreekt de link met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed mogelijk is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kan de relatie tussen voeding van de zeug en de latere reactie van haar biggen niet beantwoord worden middels in vitro onderzoek. De volgende stap is dan ook het testen van het additief in een gecontroleerde, kleinschalige kolonisatie proef in het doeldier, om de effectiviteit in vivo te bepalen.

Er kan in onze opinie niet worden volstaan met een observationele studie om de onderzoeksvraag te beantwoorden. Hierbij kenmerken wij in de beantwoording een observationele studie als "een studie zonder inoculatie / infectie-interventie met een *E. coli* of *S. suis* stam". Wij onderscheiden daarbij twee typen:

observationele studies, waarbij op individueel dierniveau mestmonsters / swabs genomen worden om de kolonisatie van de ziekteverwekker (bacterietellingen) te volgen.

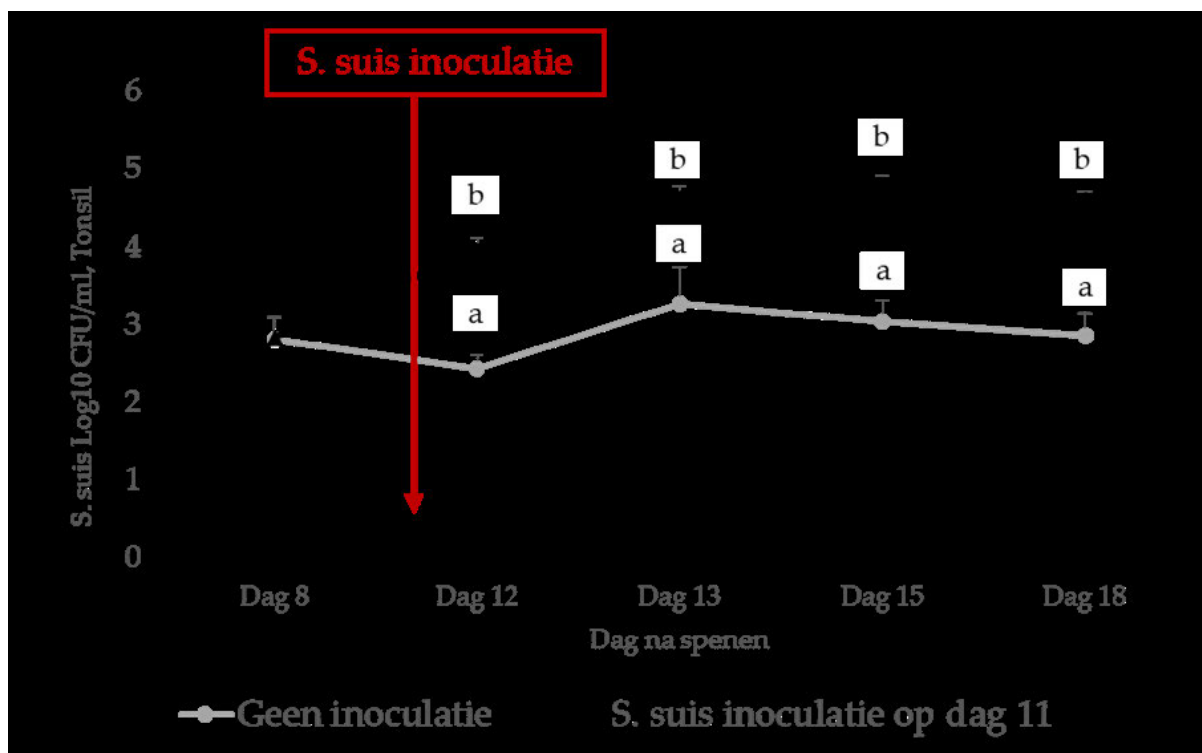
observationele studies, waarbij klinische symptomen, uitval en antibioticagebruik de primaire responsparameters zijn, en er geen bemonstering plaatsvindt.

Hieronder zullen wij puntsgewijs de argumenten benoemen waarom wij uit deze drie onderzoeksopties, de kolonisatie studie het meest geschikt achten voor het behalen van het doel van dit projectvoorstel:

□ In observationele studies (zowel met als zonder bemonstering) is de infectiedruk niet te controleren en is er daarom grote variatie in infectierisico tussen en binnen bedrijven (tussen opleg-ronden). De infectiedruk kan daarbij te hoog of te laag zijn om de effectiviteit van een voerstrategie te bepalen. Bij een te hoge infectiedruk zal curatief ingegrepen moeten worden met antibiotica om het ongerief van de dieren te beperken. Bij een te lage infectiedruk is het niet duidelijk of de ingezette voerstrategie effectief is of dat de infectiedruk laag is door diverse variabelen/ toevalligheden op een bedrijf. Dit vermindert de haalbaarheid van de proef aanzienlijk.

In een kolonisatie proef wordt gebruik gemaakt van een bekende dosis van een mild pathogene stam. Hierbij wordt er een duidelijke, voorspelbare en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen en een beperkt aantal dieren per proefgroep (ongeveer 10 dieren). Hierdoor kunnen de proeven gecontroleerd uitgevoerd worden met een voor de praktijk relevante *E. coli* of *S. suis* stam, die geselecteerd is op basis van een lage virulentie en die toch model kan staan voor ofwel *E. coli* ofwel *S. suis* in zijn algemeenheid. Hierdoor wordt gewaarborgd dat grote stappen gemaakt kunnen worden bij bevestiging van de effectiviteit van de voerstrategie, terwijl de mate van ongerief en het aantal in te zetten dieren beperkt blijft.

□ Er is nog geen duidelijk beeld wat een 'goed microbioom' is van gezonde dieren. Voor *S. suis* geldt dat deze bacterie voorkomt in het maagdarmkanaal van gezonde biggen én van biggen met een klinische *S. suis* infectie. Nagenoeg alle varkens zijn besmet met één of meerdere typen *S. suis*, meestal zonder ziekteverschijnselen. Deze varkens worden dan drager van de bacterie genoemd. Bovendien zijn sommige serotypen niet typeerbaar. De darmmicrobiota van de dieren is dan ook geen primaire responsparameter, maar kan bepaald worden om het werkingsmechanisme van een voeradditief te achterhalen / de wetenschappelijke achtergrond van een specifieke respons te vinden. Indien swabs / mestmonsters worden genomen bij dieren in een observationele studie zullen bacterietellingen minder onderscheidend zijn dan na inoculatie in een kolonisatie studie, door de aanwezigheid van diverse serotypes binnen een dier. Dit vertroebelt het beeld en maakt de resultaten minder duidelijk / minder goed aantoonbaar. Het voordeel van een kolonisatie studie is dat de stam die geïnoculeerd wordt goed te typeren is en een duidelijke stijging in kolonisatie laat zien (zie figuur 1), waarbij een vermindering van kolonisatie wordt verwacht bij de ingezette voerstrategieën en additieven.





Figuur 1. Na inoculatie met *S. suis* op dag 11 na spenen wordt er een significante toename in *S. suis* kolonisatie op de tonsillen van biggen waargenomen, bepaald door middel van tonsil swabs. De verschillende letters (a,b) geven significantie aan tussen de groep zonder en met inoculatie ( $P < 0.05$ ). Data is weergegeven als gemiddelde met standard error of the mean (SEM).

Tabel 1. Standard error of the mean (SEM) van de *S. suis* concentratie op de tonsillen in de groep biggen zonder en met inoculatie op dag 11 na spenen. Op de dagen na inoculatie is de variatie in de groep biggen met inoculatie een stuk kleiner dan in de groep biggen zonder inoculatie.

SEM	Geen inoculatie	<i>S. suis</i> inoculatie op dag 11
Dag 8	0.268	0.258
Dag 12	0.185	0.149
Dag 13	0.473	0.147
Dag 15	0.281	0.108
Dag 18	0.285	0.101

- Het voordeel van een kolonisatie studie is dat slechts een beperkt aantal dieren ingezet dient te worden ter monsternamen, omdat inoculatie de variatie tussen dieren in bacterietellingen aanzienlijk verkleint (zie tabel 1). Ter verduidelijking hebben we met een "power-berekening", gebruikmakend van data uit een eigen studie op <sup>5:11021</sup>, berekend dat zonder inoculatie per behandeling minimaal 53 dieren met behulp van swabs / mestverzameling onderzocht dienen te worden om verschillen tussen voerbehandelingen aantoonbaar te maken (uitgewerkt in bijlage 'power-berekening'). Dit is het gevolg van de grote variatie in bacterietellingen tussen dieren in een studie zonder inoculatie. Er valt in observationele studies namelijk niet te voorspellen welke dieren geïnfecteerd raken, maar ook niet op welk moment deze dieren geïnfecteerd raken, waardoor het relevante moment van monsternamen lastiger te bepalen is.
- Indien alleen naar klinische symptomen wordt gekeken in een observationele studie is het zeer de vraag of symptomen daadwerkelijk veroorzaakt worden door het type bacterie dat onderwerp is van het onderzoek. Symptomen zijn vaak niet specifiek voor één infectieus agens. Hierdoor kunnen andere ziektes / managementfactoren een invloed hebben op de gezondheid en prestaties van de dieren. Zo kan diarree bijvoorbeeld ook veroorzaakt worden door andere pathogenen, zoals bijvoorbeeld het rotavirus of *Clostridium*. Hierbij loop je dus het risico dat je onterecht stelt dat de voerstrategie effectief is tegen, in dit voorbeeld, *E. coli*. Het causale verband tussen de voerstrategie en het infectierisico op *E. coli* of *S. suis* kan daarom niet bewezen worden in een dergelijke proefopzet, waar deze onderzoeksvraag wel beantwoord wordt in het kolonisatie model.
- Indien alleen naar klinische symptomen wordt gekeken in een observationele studie is de duur van het onderzoek bovendien niet voorspelbaar, omdat deze afhankelijk is van het optreden van de klinische symptomen / de infectiedruk. Door de grote variatie tussen en binnen bedrijven zullen deze studies daarom op grote schaal plaats moeten vinden, op meerdere bedrijven over een langere termijn.

Wanneer wij de voor- en nadelen van een observationele studie afwegen tegen de voor- en nadelen van een kolonisatie studie, zien we dat:

- Met behulp van een observationele studie met inzet van bacterietellingen mogelijk een minder hoog ongerief t.g.v. de infectie wordt gezien, waardoor het een stukje "verfijning" oplevert (licht ongerief ten opzichte van matig ongerief). Echter het aantal in te zetten dieren dat tonsil swabs of mestverzameling moet ondergaan is veel hoger, waardoor aanzienlijk meer proefdieren ingezet dienen te worden en "vermindering" niet aan de orde is:  $\geq 53$  dieren per behandeling t.o.v.  $\pm 10$ .



- *Met behulp van een observationele studie zonder bacterietellingen geen ongerief, veroorzaakt door het onderzoek, wordt gezien. Echter de haalbaarheid van het beantwoorden van de onderzoeksvraag wordt aanzienlijk lager.*

b. Bij onderzoek naar additieven, in welke veranderingen en in welke effect size bent u dan geïnteresseerd? Dus niet zozeer de factoren die significantie laten zien, maar vooral de relevante effect size (rechtvaardiging)? d. De kolonisatie van bacteriële species zoals genoemd kan beïnvloed worden door micronutriënten, additieven en voeding en de literatuur heeft daar uitgebreide documentatie over. Echter, het beïnvloeden van ziektegevoeligheid door voeding, zoals uit de infectieproeven zou moeten blijken, ligt minder voor de hand (tenzij bij extremen zoals adipositas). Wel zijn voor beide infecties uitgebreid risicofactoren beschreven en toepast waarmee zowel het infectierisico als ook het ziekerisico aanmerkelijk kan worden beperkt. De meest logische stap is dan eerst het vermijden van risicofactoren voor aan infectieproeven gedacht wordt, ook al om het onderscheidend vermogen van de experimentele interventie te borgen. Wat is de onderliggende hypothese ten aanzien van verminderde ziektegevoeligheid na infectie? g. Hoe past volgens u de infectieproef in het geheel van de aanvraag (relevantie)?

*In reactie op vraag b.: We zijn op zoek naar voerstrategieën die E. coli en S. suis kolonisatie voorkomen en de ernst van deze kolonisatie verminderen wanneer het toch optreedt. In de kolonisatie modellen gebruiken we milde stammen. Door het gebruik van milde stammen op een gecontroleerde wijze worden de gevonden effecten in deze infectieproeven grotendeels gemeten als bacterietellingen en milde klinische symptomen. In de praktijk spelen E. coli en S. suis echter nog een grote rol in de morbiditeit en mortaliteit die optreedt bij biggen. De verwachte impact van de voerstrategieën in de praktijk, onder ongecontroleerde omstandigheden en waarbij soms agressievere stammen aanwezig kunnen zijn, is een lagere ziekte incidentie en verbeterde dierprestaties en dierenwelzijn.*

*Wij zijn het met u eens, zoals gesteld onder vraag d., dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd een combinatie van maatregelen vraagt, om risicofactoren zoveel mogelijk te vermijden. Allereerst zijn preventie strategieën van belang die bacteriële ziekten buiten het bedrijf houden: bijvoorbeeld hygiëne maatregelen. Indien bacteriële infecties toch aanwezig zijn op een bedrijf, zijn preventie strategieën nodig om verspreiding van de ziekte binnen het bedrijf tegen te gaan. Een derde categorie verwijst naar preventie strategieën om het dierenwelzijn en de immunocompetentie van de dieren te verbeteren, waaronder huisvesting, voeding, stressvermindering, vaccinatie en genetische selectie. Gezamenlijk kunnen deze benaderingen het vermogen van het immuunsysteem van het dier vergroten om op de juiste manier te reageren op een infectieuze ziekte, waardoor de noodzaak voor antimicrobiële behandelingen vermindert. In het verleden is vooral de preventieve en curatieve inzet van antibiotica veelvuldig toegepast. Antibiotica zijn zeer sterke middelen waarmee infectieuze aandoeningen vaak op praktijkniveau goed kunnen worden onderdrukt. Wanneer we een dergelijk sterk middel niet willen gebruiken, zullen alle andere factoren samen optimaal benut moeten worden. Een veelvuldig ingezet middel is hierbij vaccinatie. Echter, ondanks dat vaccinaties omtrent E. coli voor zeugen en biggen veelvuldig in de praktijk ingezet worden, blijft E. coli een veel voorkomend probleem bij biggen, ook bij biologische bedrijven. Daarnaast is bekend dat het waarborgen van de hygiëne als preventieve maatregel vooral op biologische bedrijven lastiger is.*

*Een zeer belangrijke factor (naast hygiëne maatregelen en vaccinaties) waarvan we steeds meer de mogelijkheden en kracht zien, is de voeding van big én zeug. Hierin speelt voeding van de zeug een belangrijke rol in het verkrijgen van voldoende biest van goede kwaliteit. De zeug heeft dan ook een belangrijke positie in deze projectaanvraag.*

*Terecht stelt de DEC dat de vermijdbare risico's in de praktijk moeten worden geminimaliseerd. Risicofactoren zijn op te delen in vermijdbaar en niet vermijdbaar. Juist de niet vermijdbare risico's kunnen worden verminderd door voeroplossingen aan te bieden.*

*Voorbeelden van moeilijk of niet vermijdbare risico's zijn:*

□ Beschikbaarheid van grondstoffen: zo dient er zo veel mogelijk gebruik gemaakt te worden van duurzaam geproduceerde grondstoffen. Hierbij komt het regelmatig voor dat er nieuwe grondstoffen uit de circulaire economie beschikbaar komen welke minder verteerbaar zijn, waardoor er meer substraat de dikke darm bereikt en er een groter risico ontstaat op de groei van pathogenen, zoals *E. coli*. Specifiek voor de biologische varkensbedrijven zijn er bovendien extra beperkingen omtrent het gebruik van grondstoffen. Bepaalde grondstoffen en voeradditieven mogen niet in biologische voeders verwerkt worden en er zijn eisen aan de herkomst van de voedermiddelen. Een voorbeeld is dat synthetische aminozuren niet zijn toegestaan in de biologische varkenshouderij. Hierdoor is het lastiger om een optimale aminozurenverhouding te realiseren. Dit kan van negatieve invloed zijn op de immunocompetentie en daarnaast neemt hierdoor het eiwitgehalte van biologische voeders toe, wat een risico is voor *E. coli* diarree.

□ Blootstelling aan mycotoxines: klimaatveranderingen zorgen voor een toenemende trend aan verhoogde niveaus aan mycotoxine besmettingen van granen en graanbijproducten. Verschillende mycotoxines kunnen de immunorespons van varkens veranderen en de vatbaarheid voor infectieziekten, zoals *E. coli*, vergroten (Oswald et al., 2003; Devriendt et al., 2009). Het is daarom van belang voor de diergezondheid om via voeding de negatieve effecten van mycotoxines tegen te gaan.

□ Verwachte (verdere) beperkingen in het zink en koper gebruik in biggenvoeders (zoals geadviseerd door het EFSA FEEDAP Panel, 2014; 2016), in verband met de negatieve effecten van deze mineralen op het milieu.

□ Pariteit van de zeug: biggen hebben een kleiner risico op mortaliteit door *S. suis* wanneer de zeug al eerder tomen met biggen heeft grootgebracht, dan wanneer het haar eerste toom is (Hopkins et al., 2018). Mogelijk speelt immunologische bescherming via de biest en de melk hierin een rol.

In reactie op vraag d.: Het beïnvloeden van de ziektegevoeligheid door voeding is zeker mogelijk en wordt ondersteund in de literatuur.

□ Verschillende reviews geven een overzicht van effectieve voedingsstrategieën tegen ziektegevoeligheid door *E. coli*, waaronder het aanpassen van de eiwit en vezelfractie van het voer, en de inclusie van bijvoorbeeld bacteriofagen, organische zuren, pre- of probiotica (Bonetti et al., 2021; Luise et al., 2020; Roselli et al., 2017; Adewole et al., 2016).

□ De rol van voeding tegen ziektegevoeligheid door *S. suis* wordt pas sinds korte tijd onderzocht. De eerste in vitro onderzoeken wijzen uit dat de beschikbaarheid van koolhydraten een rol speelt in de virulentie van *S. suis* (Ferrando et al., 2014).

Verschillende voeradditieven zoals middelketen lange vetzuren (Jackman et al., 2020; Dierick et al., 2002), laurinezuur, kaneel en glycerol monolauraat (Smith et al., 2014) bleken een bacteriedodende werking te hebben tegen *S. suis*. De effectiviteit van deze voeradditieven dient in vivo nog bevestigd te worden. In een kolonisatie studie op

kwam naar voren dat een mix van organische zuren in het drinkwater van gespeende biggen de kolonisatie van *S. suis* op de tonsillen kan verminderen.

□ In een review van IRTA (2015) is het effect van diverse immuun stimulerende additieven, zoals probiotica, plant extracten en aminozuren, op de immunocompetentie van varkens beschreven.

In het projectvoorstel onder 'achtergrond en context' worden verschillende werkingsmechanismen van bovenstaande voerstrategieën en additieven toegelicht, waaronder bijvoorbeeld 'competitive exclusion', antimicrobiële activiteit of het verbeteren van de darm barrière functie.

Samenvattend is de hypothese dat de voer-oplossingen preventief zullen werken op de infectieuze aandoeningen.

In antwoord op vraag g., past naar onze mening de infectieproef in de aanvraag om de effectiviteit van de voerstrategieën te testen in het doeldier op een gecontroleerde manier, met oog voor vermindering en verfijning. De EU moedigt onderzoekinstellingen aan om op korte termijn het gebruik en de doeltreffendheid van alternatieven voor toevoeging van zink en koper te onderzoeken. Dit omdat geanticipeerd moet worden op een verdere verlaging van deze mineraal gehalten bij de volgende herziening (zoals geadviseerd door de EFSA FEEDAP Panel, 2014; 2016). De inzet van infectiemodellen op het gebied van de twee belangrijkste infectieuze ziektes bij biggen kan juist goed bijdragen aan een 8

vermindering van het gebruik van antibiotica en mineralen, omdat de prevalentie van deze aandoeningen in de praktijk hoog is. De belangrijke rol van infectiemodellen hierin om de effectiviteit te testen wordt ondersteund door meerdere 5.1 lid2h in PPS en EU-projecten. Zo is het *S. suis* model (verder) ontwikkeld in een PPS project, en zijn er twee EU-projecten waarin we samenwerken met andere 5.1 lid2h omtrent de effectiviteit van voedingsmaatregelen in infectieproeven om de weerbaarheid van varkens tegen ziekte-uitdagingen te vergroten.

### Referenties

- Adewole DI, Kim IH, Nyachoti CM. 2016. Gut Health of Pigs: Challenge Models and Response Criteria with a Critical Analysis of the Effectiveness of Selected Feed Additives - A Review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29(7):909-924.
- Bonetti, A.; Tugnoli, B.; Piva, A.; Grilli, E. 2021. Towards Zero Zinc Oxide: Feeding Strategies to Manage Post-Weaning Diarrhea in Piglets. *Animals* 11, 642.
- Devriendt B, Gallois M, Verdonck F, Wache Y, Bimczok D, Oswald IP, Goddeeris BM, Cox, E. 2009. The food contaminant fumonisin B(1) reduces the maturation of porcine CD11R1(+) intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection. *Vet Res.* 40(4): 40.
- Dierick N, Decuypere J, Molly K, Van Beek E, Vanderbeke E. 2002. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livest Prod Sci.* 75:129-142.
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. *EFSA Journal* 2014;12(5):3668, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3668
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2016. Scientific opinion on the revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. *EFSA Journal* 2016;14(8):4563, 100 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4563
- Ferrando ML, van Baarlen P, Orrù G, et al. 2014. Carbohydrate availability regulates virulence gene expression in *Streptococcus suis*. *PLoS One.* 2014;9(3):e89334.
- Hopkins D, Poljak Z, Farzan A, Friendship R. 2018. Factors contributing to mortality during a *Streptococcus suis* outbreak in nursery pigs. *Can Vet J.* 59(6):623-630.
- IRTA. 2015. Review of immune stimulator substances/agents that are susceptible of being used as feed additives: mode of action and identification of end-points for efficacy assessment. *EFSA supporting publication* 2015:EN-905. 266 pp.
- Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *J Anim Sci Biotechnol.* 11:44.
- Luise D, Correa F, Bosi P, Trevisi P. 2020. A Review of the Effect of Formic Acid and Its Salts on the Gastrointestinal Microbiota and Performance of Pigs. *Animals (Basel).* 19;10(5):887.
- Oswald IP, Desautels C, Laffitte J, Fournout S, Peres SY, Odin M, Le Bars P, Le Bars J, Fairbrother JM. 2003. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Appl Environ Microbiol.* 69(10):5870-4. 9
- Roselli, M., Pieper, R., Rogel-Gaillard, C., de Vries, H., Bailey, M., Smidt, H., & Lauridsen, C. 2017. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. *Animal Feed Science and Technology* 233: 104-119.
- Smith, H.E., de Greeff, A., Faber, I., van der Peet-Schwering, C.M.C., Kluivers, M., Troquet, L.M.P. 2014. Literatuurstudie en in vitro onderzoek naar antibacteriële werking van voeradditieven ter vermindering van de *Streptococcus suis* problematiek. Rapport 760. Wageningen UR Livestock Research, Lelystad.

f. Hoe kan met een antibioticumbehandeling het microbioom gestandaardiseerd worden? Er wordt gerefereerd naar een small-spectrum antibioticumbehandeling. Wat wordt hiermee bedoeld?

*In de E. coli bijlage wordt één keer (bij de eerste verwijzing) foutief genoemd dat de antibioticum behandeling wordt ingezet t.b.v. standaardisatie microbioom van de biggen. Dit is niet juist geformuleerd. Excuses hiervoor. Dit is nu gecorrigeerd in bijlage1. Het gaat*

namelijk niet om het standaardiseren van het microbioom, maar om het standaardiseren van de aanwezigheid van *E. coli* in het maagdarmkanaal van de biggen (zoals verderop in de bijlage wel correct geformuleerd). Dit met als doel om mogelijke zeugen effecten te verminderen. Deze toepassing van antibioticum zal de variabiliteit van de respons van de biggen op de *E. coli* inoculatie beperken door hun fysiologische toestand vóór de inoculatie te beïnvloeden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een smalspectrum antibioticum, namelijk colistine, om de andere microben in de darm verder zo min mogelijk te beïnvloeden. Colistine wordt in het hier beschreven model al lange tijd met succes toegepast voor beschreven doel en maakt dus onderdeel uit van het gebruikte model bij onderzoek met biggen na het spenen.

h. Is er een go-no go mogelijk tussen de proef met zeugen/ zogende biggen en gespeende biggen?

*In het geval van voerstrategieën in het voer van zogende biggen zal er een go-no go beslissing plaatsvinden op moment van spenen. Dit is verduidelijkt onder '3.4.1. Strategie' in het projectvoorstel en onder 'experimentele aanpak' in de bijlagen. Hierbij is het namelijk van belang dat biggen het voer vóór het spenen consumeren om effecten van de voerstrategie te zien. Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een "no go" plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen. Verder is er geen go-no go mogelijk tussen de proef met zeugen en zogende biggen, en de proef met gespeende biggen, omdat dit om dezelfde biggen gaat die over de tijd gevolgd worden. Hierbij is het doel van de proef om het effect van behandelingen in de kraamstal te bestuderen op *E. coli* kolonisatie na het spenen. Er is dan ook geen go-no go mogelijk op bepaalde respons parameters voor het spenen. Wel vindt er een intensief selectieproces van de biggen plaats, welke per proef in de IvD aanvragen beschreven zal worden. Dit gaat dan bijvoorbeeld om het selecteren van etende en niet-etende biggen van vast voer in de kraamstal, of het selecteren van biggen op genotype of antilichaamtiter (in relatie tot biestopname of vaccinatie).*

j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.)

*Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobiom op de immunocompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobiom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de *E. coli* of *S. suis* bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.*

*Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.*

*Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.*

### **Referenties**

*Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.*

Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluivers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

Luo, L., Jansen, C.A.; Bolhuis, J.E.; Arts, J.A.J.; Kemp, B.; Parmentier, H.K. 2020. Early and later life environmental enrichment affect specific antibody responses and blood leukocyte subpopulations in pigs. *Physiology & behavior*: 112799.

k. Voorafgaand aan de *S. suis* infectieproef worden biggen gespeend en gemengd; een bekende risicofactor voor infectieziekten onder meer met *S. suis*. Worden in het onderzoek dan geen ongewenste omstandigheden van de huidige varkenshouderij als uitgangssituatie gekozen, waardoor de resultaten van dit onderzoek ook bevestigend voor het huidige houderijsysteem zijn?

*S. suis* infectie is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsproblemen bij gespeende biggen. De proeven hebben daarom als doel om de effectiviteit van voerstrategieën en additieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door *S. suis* kolonisatie in gespeende biggen. Voorafgaand aan de inoculatie worden de biggen verplaatst en/of gemengd. Wij zijn het met u eens dat het verplaatsen en mengen van biggen zoveel mogelijk voorkomen moet worden. Dit is voor ons dan ook niet de praktijkstrategie, maar een onderdeel van de kolonisatie studie: Om *S. suis* bacteriën goed te laten aanslaan in het model is het noodzakelijk om de biggen bloot te stellen aan een gestandaardiseerd stress moment voor de inoculatie. Dit wordt gedaan om de infectie beter te laten verlopen, aangezien *S. suis* een korte levensduur heeft en makkelijker kan koloniseren bij een verminderde afweer door stress. Dit verhoogt de haalbaarheid van de proef. Het model is ontwikkeld in samenwerking met andere 5.1 lid2h in een 5.1 lid2h, waarbij het verplaatsen en mixen van de dieren als stressor beter naar voren kwam dan voorbehandeling van het neusslijmvlies met azijnzuur. In de proefopzet wordt het mixen en verplaatsen dan ook niet gedaan om de huidige varkenshouderij als uitgangssituatie te nemen, maar is het een onderdeel van het model om de haalbaarheid te vergroten. Wanneer we dit niet zouden doen heeft *S. suis* minder kans zich te koloniseren, en zijn er meer dieren nodig in de proef om het effect van de voerstrategieën te bestuderen.

l. Humane eindpunten zoals vermeld zijn geen Humane eindpunten zoals wij ze bedoelen, maar GVP (Good Veterinary Practice). Gelieve hier opnieuw naar te kijken. We verwachten slechts bij hoge uitzondering (0-2% voor *E. coli* en 0-3% voor *S. suis*) een humaan eindpunt te bereiken. Hoewel er een mild pathogene stam (van *S. suis* of *E. coli*), of een lage dosering van LPS wordt gebruikt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen klinische symptomen gerelateerd aan de inoculatiestam of LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. De biggen worden daarom in de eerste periode driemaal daags gecontroleerd: 5 opeenvolgende dagen na *E. coli* inoculatie, 4 opeenvolgende dagen na *S. suis* inoculatie en de eerste 24 uur na LPS injectie. Dieren die specifieke symptomen ten gevolge van *S. suis* hebben of welke ernstige uitdrogingsverschijnselen ten gevolge van diarree hebben passend bij *E. coli*, worden direct geëuthanaseerd. Dit betekent voor *S. suis* dat in het uitzonderlijke geval van hersenverschijnselen, sepsis of ernstige kreupelheid een dier bij de eerste bijbehorende symptomen een humaan eindpunt heeft bereikt. Alle mogelijke klinische verschijnselen zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur een humaan eindpunt bereikt is. Dit schema wordt in de IvD aanvragen vastgelegd en hier zijn specifieke werkprotocollen voor tijdens de proeven. Indien gewenst kunnen deze worden opgevraagd. Wij hopen met deze brief meer duidelijkheid te hebben gegeven op uw vragen.



### Bijlage 1. "Power berekening"

Voor de poweranalyse is gebruik gemaakt van data uit een voorgaande proef met 20 biggen per proefgroep, waarbij de ene proefgroep niet geïnoculeerd werd met *S. suis*, en de andere groep wel, namelijk op dag 11 na spenen. De responsparameter voor het berekenen van het aantal herhalingen was de kolonisatie van *S. suis* (in log<sub>10</sub> CFU/ml) op dag 4 na de inoculatie (dag 15 na spenen, in de tabel geel gemarkeerd). Op basis van de steekproefomvang berekening met GenStat (GenStat20ed) betekent dit dat met een significant niveau van  $\alpha < 0,05$  en een power van 0,80 we in totaal 10 herhalingen (= biggen) per voerbehandeling nodig hebben in een model studie en 53 herhalingen (= biggen) per voerbehandeling nodig hebben in een observationele studie zonder inoculatie. Hierbij is op basis van voorgaande proeven uitgegaan van een verschil in *S. suis* kolonisatie tussen de negatieve controle groep en groep met voerstrategie van 0.7 Log<sub>10</sub> CFU/ml *S. suis*.

SEM	Geen inoculatie	<i>S. suis</i> inoculatie op dag 11
Dag 8	0.268	0.258
Dag 12	0.185	0.149
Dag 13	0.473	0.147
Dag 15	0.281	0.108
Dag 18	0.285	0.101

#### Power berekening: Model studie met *S. suis* inoculatie

```

1  SCALAR diff; VALUE = 0.7
2  SCALAR se; VALUE = 0.108
3  CALC sd = se * SQRT ( 20 )
4  CALC component = sd ** 2
5  AGHIERARCHICAL [ PRINT=*; ANALYSE=no; SEED=-1] Block,Plot;\
6  TREATMENTFACTORS=*,Treat; LEVELS=1,2 " 2 = NUMBER OF
TREATMENTS / BLOCK "
7
8  ASAMPLESIZE [PRINT=power,rep; TERM=Treat; REPLICATES=Block;
TMETHOD = twosided; \
9  TREATMENTSTRUCTURE=Treat;
BLOCKSTRUCTURE=Block/Plot;\
10 COMPONENT=component; POWER = 0.8 ] diff;
NREPLICATES=Nrep

```

### Sample size for analysis of variance

#### Power

Number of replicates	Residual d.f.	Residual m.s.	s.e.d.	RESPONSE / s.e.d.	t-value	Power
5	4	0.2333	0.3055	2.292	2.776	0.417
6	5	0.2333	0.2789	2.510	2.571	0.526
7	6	0.2333	0.2582	2.711	2.447	0.621
8	7	0.2333	0.2415	2.899	2.365	0.702
9	8	0.2333	0.2277	3.074	2.306	0.768
10	9	0.2333	0.2160	3.241	2.262	0.822
11	10	0.2333	0.2059	3.399	2.228	0.864
12	11	0.2333	0.1972	3.550	2.201	0.897
13	12	0.2333	0.1894	3.695	2.179	0.923
14	13	0.2333	0.1826	3.834	2.160	0.943
15	14	0.2333	0.1764	3.969	2.145	0.958

## Replication

To detect a treatment difference of 0.7000, at a significance level of 0.050, with a power of 0.800, using a two-sided test, requires a replication of 10.

### Power berekening: Observationale studie zonder *S. suis* inoculatie

```
1  SCALAR diff; VALUE = 0.7
2  SCALAR se; VALUE = 0.281
3  CALC sd = se * SQRT ( 20 )
4  CALC component = sd ** 2
5  AGHIERARCHICAL [ PRINT=*; ANALYSE=no; SEED=-1] Block,Plot;\
6  TREATMENTFACTORS=*,Treat; LEVELS=1,2 " 2 = NUMBER OF
TREATMENTS / BLOCK "
7
8  ASAMPLESIZE [PRINT=power,rep; TERM=Treat; REPLICATES=Block;
TMETHOD = twosided; \
9  TREATMENTSTRUCTURE=Treat;
BLOCKSTRUCTURE=Block/Plot;\
10 COMPONENT=component; POWER = 0.8 ] diff;
NREPLICATES=Nrep
```

## Sample size for analysis of variance

### Power

Number of replicates	Residual d.f.	Residual m.s.	s.e.d. RESPONSE /s.e.d.	t-value	Power	
48	47	1.579	0.2565	2.729	2.012	0.762
49	48	1.579	0.2539	2.757	2.011	0.771
50	49	1.579	0.2513	2.785	2.010	0.779
51	50	1.579	0.2489	2.813	2.009	0.788
52	51	1.579	0.2465	2.840	2.008	0.796
53	52	1.579	0.2441	2.867	2.007	0.803
54	53	1.579	0.2418	2.894	2.006	0.811
55	54	1.579	0.2396	2.921	2.005	0.818
56	55	1.579	0.2375	2.948	2.004	0.825
57	56	1.579	0.2354	2.974	2.003	0.832
58	57	1.579	0.2334	3.000	2.002	0.839

## Replication

To detect a treatment difference of 0.7000, at a significance level of 0.050, with a power of 0.800, using a two-sided test, requires a replication of 53.

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. Binnen deze uitgebreid beschreven koepelaanvraag (vervolgproject) is het doel om met voer(productie)strategieën en/of additieven de weerbaarheid van biggen tegen infectieuze aandoeningen te bevorderen, zonder hoge doses van mineralen in voer en met minder gebruik van antibiotica.

Men maakt gebruik van 3 modellen: 1) het *E. coli* kolonisatie model (uitlezen op: *uitscheiding van E. coli en mestconsistentie*) 2) het *S. suis* kolonisatie model uitlezen op: *kolonisatie van S.*



- suis op de tonsillen en de uitscheiding in de darmen*) en 3) het LPS immuun competentie model (*acute fase eiwitten, cytokines en lever enzymen* als maat voor oxidatieve stress).
2. De DEC signaleert geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op gezondheid en het welzijn van dieren of het voortbestaan van de soort, die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
  3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van de aanvraag is: door aanpassingen van dieet en voerstrategie de weerbaarheid tegen bepaalde infecties te bevorderen, te beginnen bij de zeug, vervolgens bij de biggen tijdens de zoogperiode en uiteindelijk na het spenen. Vooral gericht op weerstand tegen infecties na het spenen en ten gevolge van het spenen (speendiarree, *E. coli* en *S. suis* infecties).  
Het uiteindelijke doel is: vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen, en dus minder milieubelasting.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in deze projectaanvraag zijn:
  - De proefdieren: ervaren ongerief.
  - De doeldieren: nieuwe kennis zou kunnen leiden tot gezondheidswinst.
  - De onderzoekers: wetenschappelijke kennis en waardering.
  - De veevoederfabrikanten: economisch belang.
  - Het milieu en de maatschappij: minder milieubelasting.
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 de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij **5.1 lid2h** acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.
8. Volgens de uitgebreide beschrijving van de opzet is de uitvoering van de proeven mogelijk en de aard van de experimenten is vertrouwd. Men maakt gebruik van bestaande infectiemodellen met een beoogd mild ziekteverloop. De beargumentatie voor keuzes was in de oorspronkelijke aanvraag niet coherent, literatuuronderzoek liet te wensen over en de DEC vraagt zich af of het doel kan worden behaald. Kunnen op deze manier relevante resultaten worden behaald, is een log reductie in tonsilmonsters wel relevant? Is een infectieproef wel passend in het geheel? En met het oog op het grote aantal dieren liggen in vitro voorstudies en duidelijke go/no go momenten, die nu ontbreken, voor de hand. Zie ook A9 voor vragen die de DEC hierover heeft gesteld. De vragen zijn naar tevredenheid van de DEC beantwoord.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - x Hergebruik (1e, lid 2)De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.
10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de handelingen en onderzoekstechnieken is ingeschat en geïnclassificeerd. Dit riep in eerste instantie wel vragen op, maar na beantwoording van de vragen stemt de DEC in met de inschatting van de aanvragers. Zoals gebruikelijk gaat de DEC er vanuit dat de betrokken IvD hier ook op zal toezien.
12. Naast proefgerelateerd ongerief is er geen sprake van aantasting van de integriteit van de dieren. De heilheid en gaafheid wordt niet verder door het onderzoek aangetast.
13. Wat in de oorspronkelijke aanvraag onder humane eindpunten vermeld stond, was niet wat de DEC verstaat onder humane eindpunten. De DEC heeft ook hierover een vraag gesteld en deze is naar tevredenheid beantwoord.

14. De doelstellingen van dit project kunnen niet behaald worden, anders dan met de aangevraagde doeldieren. De onderzoeker heeft in voldoende mate aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het project als geheel. Wel vroeg de DEC zich af of een in vitro voorstudie mogelijk zou zijn, om kansrijke additieven uit te selecteren zonder gebruik van dieren. Deze vraag acht de DEC afdoende beantwoord.
15. De aantallen dieren werden in eerste instantie statistisch onderbouwd met gebruik van eerdere gegevens van de onderzoeksinstelling. Aantallen controledieren zijn onduidelijk. De dieren zijn (door herhaalde bemonstering) eigen controledier, wat wel leidt tot vermindering. De DEC zou naast de onderbouwde significantie ook vooral aandacht willen voor relevantie van resultaten. Mogelijk zijn go-no-go momenten te vervroegen in het project wanneer een vermoed effect zichtbaar is, waardoor het aantal proefdieren verminderd kan worden. Zowel de dieraantallen als de go-no-go momenten zijn bevestigd en naar tevredenheid van de DEC nader toegelicht.
16. De DEC acht het project in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven. Door adaptatieperiodes worden overgangen in diëten beperkt gehouden (stressvermindering). Handelingen worden waar mogelijk gecombineerd (minder vaak hanteren). Eetbaar strooisel is vanwege de proefopzet niet mogelijk, er is wel niet-eetbare kooiverrijking beschikbaar, die dagelijks wordt gewisseld.
17. Duplicatie van onderzoek: N.v.t.

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

18. Er wordt in dit projectvoorstel niet in gelijke mate geslachten ingezet. Dit is in de aanvraag afdoende beargumenteerd. Evident bij dit project zeugen, dus vrouwelijke dieren. Biggen wel beide geslachten. De DEC acht dit voldoende beargumenteerd.
19. Een deel van de dieren blijft in leven en gaat terug naar het bedrijf (zeugen) of wordt afgemest en geslacht. Een ander deel van de dieren wordt gedood voor weefselverzameling in het kader van de proef (biggen) of omdat ze geïnfecteerd zijn.
20. N.v.t.

*NTS*

21. De DEC acht de NTS helder en begrijpelijk geschreven; een evenwichtige weergave van het project.

**D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:  
De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.  
Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande *preventie strategieën* (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).
3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren.

**E. Advies**

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.
3. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
  - Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- 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 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

## Aanleiding

Deze aanvraag met betrekking tot drachtige en lacterende zeugen en hun biggen is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h . Hierin worden 5.1 lid2h voor zeugen en biggen onderzocht die een preventieve werking hebben op het gebied van bacteriële ziekten of een suboptimaal werkend immuunsysteem bij biggen rondom het spenen. Het project heeft als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen de belangrijkste infectieuze aandoeningen binnen de varkenshouderij te verbeteren door middel van voer-oplossingen. Hierdoor zijn dieren beter bestand tegen deze frequent voorkomende infecties. Zo kan curatief ingrijpen vaker voorkomen worden.

Het doel is daarbij om veilige en effectieve alternatieven beschikbaar te krijgen voor het gebruik van antibiotica en hoge doseringen aan mineralen in het voer van biggen. Op deze wijze kan diergezondheid en dierenwelzijn van biggen gewaarborgd worden en het milieu gespaard worden.

## Terminologie:

- Microbioom: Het geheel aan symbiotische micro-organismen die in en op een gastheer leven.
- Tonsillen (= keelamandelen): Lymfeklierweefsel gelegen achter in de keelholte op de grens tussen het ademhalingsstelsel en maagdarmkanaal met een belangrijke functie in het immuunsysteem
- Voer(productie)strategieën: grondstofkeuze, nutriëntverhoudingen en fysische eigenschappen van het voer door aanpassingen in het productieproces (zoals deeltjesgrootte van grondstoffen, het ontsluiten van grondstoffen en hardheid van de korrel) door aanpassingen in het productieproces.
- Voeradditieven: toevoegingsmiddelen in voer of drinkwater om diergezondheid te verbeteren. De additieven die getest zullen worden, zijn stoffen, micro-organismen of preparaten die geen voedermiddelen of diergeneesmiddelen zijn. In incidentele proeven gaat het om nieuwe technologieën, zoals inoculatie met darmbacteriën, en supplementen welke niet via voer of drinkwater toegediend kunnen worden, en daardoor via de bek of rectaal ingebracht dienen te worden om hun effect op de microbiota (in de darm en de tonsillen = keelamandelen) en het maag-darmkanaal uit te kunnen oefenen. Het gaat dan om bijvoorbeeld eenmalig toe te dienen stoffen of supplementen voor bijvoorbeeld pasgeboren of zogende biggen, om dat deze nog niet of nauwelijks voer of water opnemen.

## Achtergrond en context

### *Verbeteren diergezondheid en dierenwelzijn*

Binnen dit project richten we ons op het functioneren van het immuunsysteem en op twee zeer belangrijke infectieuze ziekteverwekkers bij biggen, namelijk Escherichia coli (*E. coli*, maagdaandoening) en Streptococcus suis (*S. suis*, luchtwegaandoening). Volgens de gegevens van de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD), het instituut dat pathologisch onderzoek verricht op dieren die vanuit de Nederlandse praktijkbedrijven ingestuurd worden, is in de afgelopen jaren het percentage inzendingen waarbij een maagdaandoening of luchtwegaandoening is vastgesteld, gestegen. De meeste gezondheidsproblemen bij gespeende biggen worden in Nederland toegeschreven aan Streptokokken (nr. 1 met 42%) en *E. coli* (nr. 2 met 8%). Bovendien is volgens data van 5.1 lid2h (GD, 2018) *E. coli* met 30% de meest gestelde diagnose voor maagdaandoeningen bij varkens.

Zowel *E. coli* als *S. suis* bacteriën kunnen leiden tot ernstige ziekteverschijnselen en zij zijn verantwoordelijk voor een groot deel van de biggensterfte (Van der Peet-Schwering, 2008; GD Deventer, 2018). Deze ziektes beïnvloeden daarmee diergezondheid en dierenwelzijn negatief. 80% van de Europeanen is van mening dat het dierenwelzijn beter moet worden beschermd dan nu het geval is (Europese Commissie, 2016). In de 'Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023' (2013) is dan ook afgesproken om in de periode naar 2023 toe concrete resultaten in Nederland te boeken voor wat betreft diergezondheid en dierenwelzijn. Hoewel het infectieverloop van *E. coli* en *S. suis* steeds beter bekend zijn, zijn er nog weinig effectieve preventieve maatregelen.

### *Verlaging van gebruik van antimicrobiële middelen*

Ondanks het feit dat diagnoses voor het inzetten van antibiotica niet centraal worden vastgelegd, is het plausibel dat *S. suis* een belangrijke indicatie is voor het inzetten van penicillines (KNMVD, 2014; GD, 2017) en *E. coli* voor het inzetten van colistine (SDa, 2020). Door het antibioticagebruik in de veehouderij te verminderen kan het ontstaan van antibioticaresistenties beperkt worden. Dit is van belang voor dieren- en volksgezondheid, omdat resistente bacteriën van dieren op mensen overgedragen kunnen worden. Dit project draagt daarom indirect bij aan het duurzaamheidsdoel 'volksgezondheid' van de Nederlandse

veehouderij (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023, 2013). Daarnaast is *S. suis* een zoönose, die ook op directe wijze de volksgezondheid in gevaar kan brengen. Als er minder dieren besmet worden met *S. suis*, is het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens. In Europa komen *S. suis* infecties met name voor bij [dierenartsen](#), varkenshouders en slachthuismedewerkers ([Elbers et al., 1999](#); [Strangmann et al., 2002](#)). In Zuid-Oost Azië en China beperken de *S. suis* infecties zich niet tot deze beroepen en zijn er uitbraken van *S. suis* geweest. In Vietnam is *S. suis* zelfs de belangrijkste veroorzaker van hersenvliesontsteking bij de mens (Trung et al., 2012). Door kennis over de preventie van *S. suis* infecties bij varkens uit te dragen naar nationale en internationale klanten dragen we bij aan het verlagen van het risico op deze zoönose.

Alhoewel de varkenssector erin geslaagd is het totale antibioticagebruik in de varkenshouderij in 2019 te verlagen ten opzichte van 2018, steeg het gebruik van antibiotica die ingezet wordt bij *E. coli* infecties (SDa, 2020). Deze stijging is te koppelen aan het verlagen van het maximumgehalte van mineralen zoals zink (Zn) en koper (Cu) in biggenvoeders.

Zink en koper werden en worden met succes ingezet in hoge doseringen in biggenvoeders met het doel om een sterke daling in kolonisatie van pathogenen en een positief effect op de darmfysiologie (bijvoorbeeld minder villusatrofie na het spenen) te bewerkstelligen. Echter, op basis van de negatieve effecten die Zn en Cu op het milieu hebben, heeft de EU het maximaal toegestane gebruik van Zn en Cu in biggenvoeders beperkt vanaf respectievelijk 2016 (EU 2016/1095) en 2018 (EU 2018/1039). Tevens geeft de EU in deze uitvoeringsverordeningen aan dat er geanticipeerd moet worden op een verdere verlaging van Zn en Cu gehalten bij de volgende herziening (zoals geadviseerd door de EFSA FEEDAP Panel, 2014; 2016). De EU moedigt onderzoekinstellingen aan om snel het gebruik en de doeltreffendheid van alternatieven voor de toevoeging van Zn en Cu te onderzoeken. Vanaf 2022 zal het in de EU verboden zijn om Zn in farmaceutische gehalten toe te voegen aan speenvoeders. Hoewel dit in Nederland al sinds mei 2018 verboden is, moeten sommige andere Europese landen, bijvoorbeeld Denemarken, nog volgen. Om de infectiedruk onder controle te houden is het daarom van essentieel belang om effectieve preventieve maatregelen tegen infectieuze ziekten te zoeken in o.a. de voeding. Hierdoor kunnen concrete stappen tot verduurzaming gezet worden om de bodem- en waterkwaliteit in Nederland te verbeteren (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023, 2013).

### **De invloed van de voeding van zeug en zogende big op darmgezondheid en het immuunsysteem.**

In onderzoek uitgevoerd in de afgelopen jaren onder projectvergunning AVD [5.1 lid2h](#) en in internationaal onderzoek is gezien dat de gezondheid en voeding van de zeug van grote invloed kan zijn op het microbioom van het maagdarmkanaal en de voorste luchtwegen bij haar nakomelingen. Vanaf geboorte tot ongeveer 2 weken na spenen is de microbiota samenstelling in de darm nog volop in ontwikkeling, en nog niet stabiel (Guavarra et al., 2019), waardoor deze gemakkelijk uit balans kan raken. Biggen met en zonder spendiarree als gevolg van *E. coli* besmetting bijvoorbeeld, verschillen niet alleen tijdens de diarree-periode in hun microbiota samenstelling, maar hun darm microbiota is al verschillend enkele weken voor het begin van de diarree, in de periode vóór het spenen ([5.1 lid2h](#), 2019; Dou et al., 2017). Dit geeft aan dat de darmkolonisatie een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van diarree en dat de darm microbiota in het 'vroege leven' van de biggen het latere risico op diarree kan beïnvloeden. De darmkolonisatie in het vroege leven wordt grotendeels beïnvloed door de zeug. Biggen worden namelijk relatief steriel geboren, waarbij ze de microbiota van de zeug meekrijgen tijdens geboorte (uit de mest en geboorte kanaal) en na geboorte (via colostrum, melk, huid en mest). Op de dag van geboorte is er dan ook een grote overeenkomst in de darm microbiota van de zeug en haar biggen. Dit biedt mogelijkheden om de kolonisatie van darmbacteriën van de biggen te moduleren via voerstrategieën bij de zeug rondom het werpen.

Ook *S. suis* kan reeds tijdens de geboorte (Amass et al., 1996) of tijdens het zogen van de zeug naar de biggen worden overgebracht. Daarnaast kunnen biggen de bacterie op elkaar overdragen in kraamstal of gespeende biggenstal (Dekker et al., 2013). Kolonisatie van *S. suis* in een gezonde big kan plaatsvinden zonder dat het dier ziek wordt (ontstaan van zogenaamde dragers).

Uit eerder onderzoek binnen [5.1 lid2h](#) is gebleken dat het voor een deel van de voerstrategieën en additieven zinvol kan zijn om de voeding van zeugen en zogende biggen mee te nemen in de gebruikte modellen. Daarom worden in dit projectvoorstel niet alleen modellen bij gespeende biggen beschreven maar ook modellen waarbij de voeding van de zeug en zogende biggen reeds meegenomen wordt. Voor de praktijk is het haalbaar en nuttig om al vroegtijdig, dus bij voeding en management van de zeug en zogende biggen in te grijpen zodat dierziektes preventief kunnen worden aangepakt. In dit kader kan ook de interactie van voerconcepten met vaccinaties volgens de reguliere praktijk meegenomen worden in het onderzoek.

### Escherichia coli infecties

Escherichia coli (E. coli) is een gram-negatieve bacterie, welke zich koloniseert in het maag-darmkanaal. E. coli infecties kunnen zich uiten in diarree in de eerste week na geboorte (18% van de gezondheidsproblemen bij zogende biggen), waarbij vaak de hele toom ziek is. Daarnaast komt het veel voor in de eerste 2 weken na het spenen (nr. 2 van de gezondheidsproblemen bij gespeende biggen).

De darm microbiota kunnen door veranderingen in de omgeving, zoals het spenen, uit balans raken. Door verandering in voer en stress op het moment van spenen eet een big tijdelijk niet tot zeer weinig. Als het dier daarna weer begint met eten, krijgt de E. coli bacterie de kans zich te vermenigvuldigen onder invloed van aanwezigheid van veel onverteerd substraat in de darm en een onbalans in microbiota samenstelling. Om ziekte te veroorzaken moet de E. coli zich via aanhechtingsfactoren (zoals F4) aan de wand van de dunne darm hechten. Vervolgens produceert hij toxines (zoals hitte labiel/stabiel toxine) welke de darmcellen aantasten, wat resulteert in een verminderde absorptie en toename van vochtverlies via de darm. Kenmerkend voor een E. coli infectie is (waterige) diarree, verminderde absorptie door aantasting van de darmvilli (bij gespeende biggen), verminderde groei, en sterfte door uitdroging.

### Preventie van E. coli infecties door middel van voeding

Onderstaand worden enkele voorbeelden beschreven van voer(productie)strategieën en additieven die op het moment van schrijven het meeste perspectief bieden om via voeding invloed uit te oefenen op E. coli bacteriën en hun toxines:

- *Voer(productie)strategieën:*
  - Grondstofkeuze, nutriëntverhoudingen en fysische eigenschappen van het voer kunnen van grote invloed zijn op het voorkomen van E. coli infecties.  
Hierbij kan gedacht worden aan verlaging van het eiwitgehalte rondom spenen, het toevoegen van prebiotica zoals voedingsvezels en bijvoorbeeld het optimaliseren van het aandeel aan fermenteerbare en inerte koolhydraten (5.1 lid2e 2014). Hierbij is ook het moment waarop (bijvoorbeeld rondom werpen) niveaus aan koolhydraten hoger ofwel lager zijn van belang (Cheng et al. 2018, Feyera et al. 2017). De werkingsmechanismen die van belang zijn binnen deze strategische wijzigingen in nutritionele kenmerken kunnen variëren: de darm microbiota samenstelling kan bijvoorbeeld wijzigen, de darm barrière functie kan verbeterd worden of de kwaliteit en/of kwantiteit van de colostrum kan verbeteren. Ook de verteerbaarheid van nutriënten en aanwezigheid van antinutritionele factoren (ANF's) in grondstoffen spelen een rol. ANF's, bijvoorbeeld glucosinolaten in raapzaad en alkaloiden in aardappelwit (Liener et al. 1994) kunnen een irriterend effect hebben op de darmwand hebben of de verteerbaarheid negatief beïnvloeden. Door grondstoffen met ANF's te behandelen (verhitten, extractie, concentraat) kunnen ANF's worden geïnactiveerd en kan de weerbaarheid tegen E. coli worden verbeterd.
- *Additieven, bijvoorbeeld:*
  - *Organische zuren:* Ook organische zuren zouden een positief effect kunnen hebben op het voorkomen van E. coli infecties (Jiménez et al., 2020; Suiryanrayna and Ramana, 2015; Tsiloyiannis et al., 2001), door de positieve invloed op vertering van nutriënten en hun antimicrobiële functie.
  - *Probiotica en fermentatieproducten:* Probiotica zijn levende bacteriën en gisten (bijv. Saccharomyces cerevisiae: Trevesi et al., 2015, 2017) die een positief effect op de gezondheid hebben wanneer ze in voldoende hoeveelheden worden geconsumeerd. Via verschillende routes kunnen probiotica E. coli infecties voorkomen (Dubreuil, 2017; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2016). Dit kan via competitie op het gebied van aanhechting aan de darmwand of voor het beschikbare voedsel in de darm, productie van antimicrobiële bestanddelen zoals bacteriotoxinen en effecten op het immuunsysteem. Onder andere op 5.1 lid2h is gebleken dat probiotica ook de vertering van nutriënten kunnen verbeteren, waardoor er minder beschikbaar voedsel is voor E. coli om zich te vermeerderen. Het succes van probiotica in de preventie van E. coli infecties is o.a. afhankelijk van de gebruikte micro-organismen en hun interactie met de voercomponenten. Uit onderzoek van 5.1 lid2h is ook gebleken dat fermentatieproducten van bepaalde Lactobacillus stammen als alternatief voor hoge concentraties van zink oxide ingezet zou kunnen worden om E. coli infecties te voorkomen (5.1 lid2h, 2017).
  - *Orale antilichamen:* Orale antilichamen kunnen voorkomen dat de E. coli zich kan hechten aan de dunne darm (Viridi et al., 2013; 2019).



### **Streptococcus Suis infecties**

Streptococcus suis (S. suis) is een gram-positieve bacterie. Deze bacterie kan op verschillende manieren en momenten overgedragen worden, namelijk

- direct van zeug op big tijdens de geboorte en tijdens het zogen
- tussen biggen onderling in kraamstal en gespeende biggenstal
- via materialen
- via de lucht en
- via mensen

S. suis (serotype 2) is ook een zoönose. Dit betekent dat bij overdracht van de bacterie van varkens(vlees) op mensen, mensen ernstige ziekteverschijnselen kunnen krijgen, zoals bijv. hersenvliesontsteking.

De S. suis bacterie komt voor in de bovenste luchtwegen (hecht voornamelijk aan de tonsillen en neusholtes), het genitaal stelsel en het maag-darmkanaal van varkens. Kolonisatie van S. suis in een gezonde big kan plaatsvinden zonder dat het dier ziek wordt (dier wordt dan drager genoemd). Echter, bij kolonisatie van een virulente stam van S. suis (overdracht via een besmet varken met virulente S. suis stam in de groep) of bij een verminderde afweer van het dier (bijv. door een virus infectie, stress van spenen, transport stress, verandering in voer) kunnen deze bacteriën op later moment leiden tot ernstige klinische verschijnselen. Zo zorgt bijvoorbeeld E. coli besmetting voor verzwakking van de weerstand van biggen, waardoor er gemakkelijker een S. suis infectie kan opspelen, bijvoorbeeld na het spenen. Rondom spenen is de prevalentie van S. Suis infecties dan ook het hoogst.

De pathogenese van S. suis wordt tot dusver nog niet volledig begrepen. De eerste stappen van infectie zijn bacteriële kolonisatie (hechting en vermeerdering), waarna translocatie over de epitheliale barrière plaatsvindt naar de circulatie toe, gevolgd door verspreiding naar verschillende organen. Bij varkens speelt de kolonisatie van de bovenste luchtwegen waaronder de tonsillen (Gaiser et al., manuscript in voorbereiding) en het maag-darmkanaal een belangrijke rol bij infecties van S. suis bij biggen (Wertheim et al., 2009; Su et al., 2008).

Voedingsstoffen, voornamelijk koolhydraten, in de mondholte en het maag-darmkanaal worden door S. suis bacteriën gebruikt om zich te vermeerderen. Wanneer S. suis in de circulatie terecht komt, kunnen de bacteriën zich aanhechten aan de endotheelcellen van bijvoorbeeld de bloedhersenbarrière, gewrichten of hartkleppen leidend tot hersenvliesontsteking, gewrichtsontsteking of hartklepontsteking en secundair longontsteking. Ook kunnen de bacteriën aanleiding geven tot een ongereguleerde afgifte van ontstekingsmediatoren vanuit de lever, wat meestal leidt tot plotselinge sterfte. Vooral hersenvliesontsteking gaat vaak gepaard met koorts, waardoor biggen met hersenvliesontsteking snel kunnen uitdrogen en plots dood kunnen gaan. Biggen met minder ernstige symptomen van een S. suis infectie maken een zieke indruk, hebben weinig eetlust, lopen moeilijk en hebben koorts. S. suis infecties kunnen snel (binnen 24 uur) leiden tot tientallen sterftegevallen, waardoor tijdig ingrijpen van groot belang is. De acute vorm kan ook overgaan tot een chronische vorm met blijvende kreupelheid. Tot op heden is er geen commercieel vaccin beschikbaar dat effectief beschermt tegen alle S. suis-serotypen. In Nederland wordt wel door diverse zeugenbedrijven preventief gevaccineerd met een bedrijfsspecifiek vaccin (autovaccin).

### **Preventie van S. suis infecties door middel van voeding**

Omdat S. suis o.a. in de darmen, het speeksel en op de tonsillen voorkomt zijn er mogelijkheden om S. suis infecties te voorkomen door middel van voer(productie)strategieën en voeradditieven. Onderstaand worden enkele voorbeelden beschreven van strategieën en additieven die op het moment van schrijven het meeste perspectief bieden:

- *Voer(productie)strategieën:*

S. suis groeit het beste op koolhydraten en zetmeel, waardoor een andere voersamenstelling het beschikbare voedsel voor S. suis en daardoor de groei ervan zou kunnen verminderen. Welke voercomponenten (bijv. monosachariden, disachariden of polysachariden) exact een rol spelen in de virulentie van S. suis is nog onbekend (Ferrando et al., 2014). Daarnaast lijkt 'overprocessing' van zetmeel invloed te hebben op de groei van S. suis (5.1 lid2h, 2018).

- *Additieven, bijvoorbeeld:*

- *Middelketen lange vetzuren:* Er zijn aanwijzingen dat middelketen lange vetzuren in het voer door hun directe antimicrobiële effect de groei van S. suis zouden kunnen remmen (Jackman et al., 2020; Dierick et al., 2002).
- *Organische zuren:* Een mix van organische zuren in het drinkwater van gespeende biggen kan de kolonisatie van S. suis op de tonsillen verminderen (5.1 lid2h, 2020) door de maag pH laag te houden

- *Probiotica*: Probiotica gegeven aan zeugen of zogende biggen (via oraal supplement) zouden de microbiota ontwikkeling van biggen zo kunnen beïnvloeden dat *S. suis* zich niet kan koloniseren ('competitive exclusion' genoemd).

Onderzoek voor wat betreft preventie van *S. Suis* is volop in ontwikkeling, dus ook andere voeroplossingen kunnen waarschijnlijk perspectief bieden in de preventie van *S. suis*, zoals bijvoorbeeld producten die de hoeveelheid onverteerd substraat in de darm laag kunnen houden en die de darm barrière functie kunnen versterken.

### **Een verminderde immuun competentie: ontstekingsreacties en oxidatieve stress**

Immuun competentie omvat het vermogen van een dier om adequaat te reageren op immunologische bedreigingen. Het dier beschikt over een arsenaal aan verdedigingsmechanismen tegen bedreigingen, die samen dit vermogen bepalen. De immuun competentie van een dier wordt mede bepaald door de interactie tussen voer, de darm microbiota en de cellen van het immuun systeem in de darmwand.

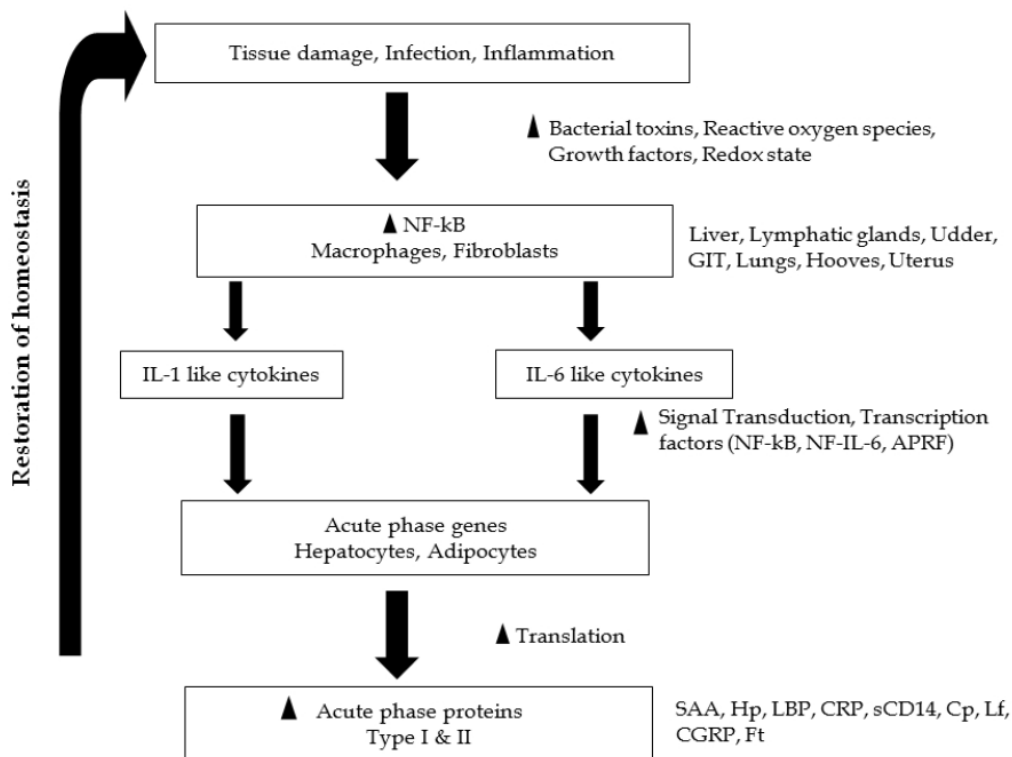
In de dunne darm zit 70-80% van de immuuncellen (Furness et al., 1999; Vighi et al., 2008) en ook de immuunactivatie en het imprints van het immuunsysteem bij jonge dieren vindt hier plaats (bijv. Clarke, et al., 2010; Hall et al., 2008; Smith et al., 2007; Round & Mazmanian, 2009). Het immuun systeem van de darm moet zich na de geboorte nog verder ontwikkelen. De ontwikkeling van de darm bacteriën begint tijdens het geboorteprocess en loopt door na het spenen (Frese et al., 2015). Deze darm bacteriën zijn van grote invloed op de ontwikkeling van het immuun systeem in de darm. Omdat de immuun competentie vorm krijgt in de eerste levensweken, kan deze bij (landbouwhuis)dieren worden verbeterd door matemale of neonatale nutritionele interventie.

Voerstrategieën op jonge leeftijd hebben meestal een langdurig effect op de immuun competentie, terwijl deze op latere leeftijd een meer tijdelijk effect hebben. Daarom is het belangrijk om de immuun ontwikkeling van biggen al vanaf een jonge leeftijd (pre- en postnataal) optimaal te ondersteunen middels voeding (van de zeug en zogende biggen).

Daarnaast zorgen veranderende omgevingsomstandigheden tijdens het spenen van biggen ervoor dat de immuun competentie van biggen meer onder druk komt te staan en het immuun systeem geactiveerd wordt. Zo ontstaan door de stress en de lage voeropname beschadigingen aan de darmwand, waardoor pathogenen gemakkelijker een infectie kunnen veroorzaken. Daarnaast is de voerovergang op spenen verantwoordelijk voor een grote verandering in de darm microbiota (Frese et al., 2015). Deze veranderingen vinden plaats terwijl er geen passieve immuniteit van de zeug meer is na het spenen, en de actieve immuniteit van de big zich nog volop aan het ontwikkelen is.

### *Reactie van het immuunsysteem op infecties en darmschade.*

In figuur 1 wordt weergegeven hoe het immuunsysteem reageert op bedreigingen voor het organisme (bijvoorbeeld infectieuze aandoeningen, weefselbeschadiging, ontsteking, toxines).



Figuur 1. Activatie van het immuunsysteem en responsparameters (Ametaj et al. 2010)

De belangrijkste regulator in het lichaam voor wat betreft ontstekingen is de zogenaamde transcriptie factor NF-κB (Pantano et al., 2006, Ametaj 2010). Deze NF-κB wordt bij herkenning van pathogene infecties en/of darmschade geactiveerd. Ook een overmaat aan oxidanten zorgt voor activatie van NF-κB. De activatie van NF-κB zorgt voor verhoging van de productie van specifieke signaal eiwitten, de cytokines. Er zijn zowel cytokines die de ontsteking stimuleren (pro-inflammatoire cytokinen zoals IL-1, IL-6 en TNF-α) als cytokines die de ontsteking remmen (anti-inflammatoire cytokines zoals IL-4 en IL-10). In geval van darmschade en infecties komen de pro-inflammatoire cytokines vrij (Moya et al., 2006; Nordgreen et al., 2018). Door het vrijkomen van deze pro-inflammatoire cytokines, komen prostaglandinen vrij in de hypothalamus, het hersendeel dat de temperatuurregulatie verzorgt, en verandert het 'set-point' van de lichaamstemperatuur. Hierdoor treedt koorts op. De cytokines circuleren door het lichaam en met name de lever reageert hierop door acute fase-eiwitten (zoals haptoglobine) te maken (Carroll et al., 2005; Moya et al., 2006). Cytokines, acute fase-eiwitten en de lichaamstemperatuur worden daarom veelal gebruikt om de immuun competentie van biggen bij infecties in kaart te brengen.

#### Functie van vrije radicalen.

Tijdens cel metabolisme, inclusief immuunsysteemprocessen, worden vrije radicalen (ROS = Reactive Oxygen Species = oxidanten) geproduceerd. Vrije radicalen zijn zeer onstabiele verbindingen die leiden tot de vorming van reactieve peroxiden in de cellen. Vrije radicalen en peroxiden reageren met en beschadigen verschillende cel componenten, tenzij ze worden afgebroken tot minder reactieve verbindingen door zogenaamde antioxidanten.

Antioxidanten zijn stoffen die deelnemen aan chemische reacties die oxidatieve schade voorkomen. Oxidatieve stress wordt beschouwd als het resultaat van een onbalans tussen de productie van ROS en het vermogen van het lichaam om met antioxidanten ROS af te breken (Reuter et al., 2010; Pi et al., 2010). Als het anti-oxidatieve afweersysteem tekort schiet, wordt het immuunsysteem beperkt in zijn functie. Naast een verminderde immuniteit zorgt een onbalans met hoge ROS concentraties voor spierafbraak, verlies van eetlust, diarree, leverschade en uiteindelijk celdood, die de functie en overleving van het hele dier beïnvloeden (Yin et al., 2013).

In biggen komt oxidatieve stress met name voor na het spenen (Zhu et al., 2012). Oxidatieve stress houdt rechtstreeks verband met ontsteking vanwege het feit dat oxidanten NF-κB kunnen activeren. Ontsteking van de darm na het spenen gaat daarom ook gepaard met oxidatieve stress. Biggen zijn na het spenen

daarom extra gevoelig voor het oplopen van infectieuze ziektes. Om de negatieve effecten van deze veranderingen na het spenen (onbalans in darm-fysiologie, -microbiota, en -immunologie) zo goed mogelijk op te vangen, is het van belang om vóór en na het spenen het immuunsysteem van biggen optimaal te ondersteunen. Daarom wordt er gezocht naar voer(productie)strategieën en voeradditieven die een positieve bijdrage kunnen leveren aan de immuun competentie van biggen.

### **Het bevorderen van de immuun competentie via voeding**

Omdat het immuunsysteem van biggen nog volop in ontwikkeling is en het grootste gedeelte van de immuuncellen voorkomen in de darmwand, biedt dit de mogelijkheid om de immuun competentie van biggen te bevorderen door middel van voer(productie)strategieën en additieven zoals bijvoorbeeld:

- *Voer(productie)strategieën:*
  - *Amino-zuren:* Toevoeging van bepaalde amino-zuren zoals arginine of aspartaat in het speenvoer kan zorgen voor bijvoorbeeld een verbeterde antioxidant status of verbeterde darm morfologie en barrièrefunctie (Bergeron et al., 2014; Pi et al., 2014).
  - *Vetzuren:* Bepaalde meervoudig onverzadigde vetzuren in het voer lijken de darmintegriteit van gespeende biggen te verbeteren (Liu et al., 2012).
  - *Mineraalbron:* Uit onderzoek op 5.1 lid2h is gebleken dat het gebruik van een organische selenium bron in het voer in plaats van een anorganische selenium bron een positief effect had op de immuun respons van gespeende biggen na immuun stimulatie, door de productie van anti-inflammatoire cytokines te stimuleren en oxidatieve stress te verminderen (5.1 lid2h, 5.1 lid2e).
- *Additieven, bijvoorbeeld:*
  - *Harszuren:* Harszuren uit naaldbomen hebben een anti-inflammatoire werking en als deze aan het voer van gespeende biggen toegevoegd worden dan hebben deze biggen een lagere concentratie van een darmontsteking biomarker en een veranderde cytokine productie dan biggen zonder harszuren in het voer (5.1 lid2h, 2020).
  - *Pre- en probiotica:* Er zijn indicaties dat pre- en probiotica de productie van pro- en anti-inflammatoire cytokines, en daarmee de immuun competentie van biggen, kan beïnvloeden (San Andres et al., 2019; Chen et al., 2020).

### Invloed van het voeren van de zeug en/of zogende biggen

De voeding van de zeug tijdens dracht, rondom werpen en tijdens lactatie, en de voeding van zogende biggen, kan ook invloed hebben op de immuuncompetentie van gespeende biggen. Zo hadden gespeende biggen waarvan de zeugen gist extract *Pichia guilliermondii* in het voer kregen tijdens dracht en lactatie meer antilichaam IgG in het bloed en een veranderde immuuncel populatie en immuunrespons dan gespeende biggen van controle zeugen. Bovendien waren de effecten op de immuunrespons sterker (additief effect) wanneer de biggen dit gist extract zelf ook in het voer na spenen kregen (Bass, 2012). Daarnaast produceerden bepaalde immuuncellen van zogende biggen die oraal gesupplementeerd werden met  $\beta$ -glucanen meer van anti-inflammatoire cytokine IL-10 dan biggen die geen  $\beta$ -glucanen binnenkregen (De Vries et al., 2020).

### **Onderzoek**

Binnen dit project worden strategieën getest die erop gericht zijn om de balans van het microbioom in maagdarm kanaal en / of luchtwegen en het immuunsysteem bij biggen te verbeteren.

Om strategieën en additieven op een effectieve en gecontroleerde wijze te testen heeft 5.1 lid2b drie verschillende diermodellen ontwikkeld /in gebruik. Binnen twee van deze modellen wordt gebruik gemaakt van goed gekarakteriseerde en milde stammen van de twee meest voorkomende bacteriën in de varkenshouderij. Binnen deze modellen is het doel om de kolonisatie van de bacteriën met voeding tegen te gaan. Met het derde model wordt direct het immuunsysteem geactiveerd en hiermee kan het effect van voeding op immuun competentie worden getest.

Uit onderzoek onder onze vorige projectvergunning is gebleken dat we met het E. coli kolonisatie model, het S. suis kolonisatie model en het LPS immuun competentie model goede resultaten kunnen boeken voor wat betreft het vinden van alternatieve voermaatregelen, welke vertaald kunnen worden naar de praktijk. Afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie en zijn werkingsmechanisme kunnen deze getest worden in één van onderstaande modellen, welke gericht zijn op een specifiek onderdeel van het immuunsysteem:

- E. coli kolonisatie model: Dit model wordt ingezet wanneer voeradditieven of voer(productie)strategieën gebruikt worden die een specifiek effect zouden hebben op E. coli infecties bij biggen. In het model worden gespeende biggen oraal geïnoculeerd met een milde stam van E. coli. De dieren ontwikkelen voor enkele dagen milde symptomen zoals dunne mest.

*De uitscheiding van E. coli en mestconsistentie zijn de belangrijkste uitleesparameters zijn.*

- S. suis kolonisatie model: Dit model wordt ingezet wanneer voeradditieven of voer(productie)strategieën gebruikt worden die een specifiek effect zouden hebben op de kolonisatie van S. suis bij biggen. In het model worden gespeende biggen oraal en nasaal geïnoculeerd met een milde stam van S. suis. De dieren kunnen tijdelijk lichte symptomen zoals een verhoogde lichaamstemperatuur vertonen.

*De kolonisatie van S. suis op de tonsillen en de uitscheiding in de darmen zijn de belangrijkste uitleesparameters.*

- LPS immuun competentie model: Het best gekarakteriseerde model voor immuun activatie en oxidatieve stress in biggen is de lipopolysaccharide (LPS) geïnduceerde immuun activatie, welke in deze aanvraag 'LPS immuun activatie model' genoemd zal worden. LPS is een bestanddeel van bacteriewanden, welke (binnen enkele uren) een acute ontstekingsreactie kan veroorzaken (zie Figuur 1). De ontstekingsreactie na LPS injectie activeert onder andere enzymen die vrije radicalen vormen, waardoor er oxidatieve cel schade ontstaat (Kadiska et al., 2015). LPS is daarom ook een goed model voor oxidatieve stress in biggen (Hou et al., 2014).

*Parameters passend bij oxidatieve stress en reactie van de lever, zoals acute fase eiwitten, cytokines en lever enzymen zijn de belangrijkste uitleesparameters.*

## Referenties

- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. EFSA Journal 2014;12(5):3668, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3668
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2016. Scientific opinion on the revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. EFSA Journal 2016;14(8):4563, 100 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4563
- Europese Commissie. 2016. Uitvoeringsverordening (EU) 2016/1095 tot verlening van een vergunning voor zinkacetaat-dihydraat, watervrij zinkchloride, zinkoxide, zinksulfaat-heptahydraat, zinksulfaat-monohydraat, zinkchelaat van aminozuren, gehydrateerd, zinkchelaat van eiwithydrolysaten, zinkchelaat van glycinehydraat (vast) en zinkchelaat van glycinehydraat (vloeibaar) als toevoegingsmiddelen voor diervoeding voor alle diersoorten en tot wijziging van Verordeningen (EG) nr. 1334/2003, (EG) nr 79/2006, (EU) nr. 335/2010 en Uitvoeringsverordeningen (EU) nr. 991/2012 en (EU) nr. 636/2013. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R1095&from=EN>
- Europese Commissie. 2018. Uitvoeringsverordening (EU) 2018/1039 tot verlening van een vergunning voor koper(II)diacetaat-monohydraat, koper(II)carbonaatdihydroxide-monohydraat, koper(II)chloride-dihydraat, koper(II)oxide, koper(II)sulfaat-pentahydraat, koper(II)chelaat van aminozuren, gehydrateerd, koper(II)chelaat van eiwithydrolysaten, koper(II) chelaat van glycine, gehydrateerd (vast), en koper(II)chelaat van glycine, gehydrateerd (vloeibaar), als toevoegingsmiddelen voor diervoeding voor alle diersoorten en tot wijziging van de Verordeningen (EG) nr. 1334/2003, (EG) nr. 479/2006 en (EU) nr. 349/2010 en de Uitvoeringsverordeningen (EU) nr. 269/2012, (EU) nr. 1230/2014 en (EU) 2016/2261. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1039&from=NL>
- Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023. 2013. [5.1 lid2h](#), [5.1 lid2e](#)
- GD Deventer, 2018. Monitoring dieiergezondheid varkens: rapportage eerste halfjaar 2018. Online Monitor: stand van zaken 2018. p19-21.
- Ametaj B.M. et al. Review of Acute Phase Proteins for monitoring inflammatory states in cattle. ISBN:978-953-307-873-1. InTech. <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-as-early-non-specific-biomarkers-of-human-and-veterinary-diseases/application-of-acute-phase-proteins-for-monitoring-inflammatory-states-in-cattle>.
- Dou S, Gadonna-Widehem P, Rome V, Hamoudi D, Rhazi L, Lakhali L, et al. (2017) Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. PLoS ONE 12(1): e0169851.
- Strangmann E, Froleke H, Kohse KP. 2002. Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group, Int J Hyg Environ Health 205: 385-92.
- Elbers AR, Vecht U, Osterhaus AD, et al. 1999. Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands, Vet Q 21: 50-4.
- Trung, H.D., N, Le Thi Phuong T, Wolbers M, Nguyen Van Minh H, Nguyen Thanh V, Van MP, et al. 2012. Aetiologies of Central Nervous System Infection in Viet Nam: A Prospective Provincial Hospital-Based Descriptive Surveillance Study. Plos One. 7(5):e37825.
- Van der Peet-Schwering C.M.C., Binnendijk G.P, Kuijken N., Raymakers R. (2008). Beheersing van *Streptococcus suis* bij gespeende biggen door managementmaatregelen. Animal Sciences Group Wageningen UR. Rapport 119
- Europese Commissie. 2016. Special Eurobarometer 442 – Attitudes of Europeans towards animal welfare. <https://ec.europa.eu/commfrontoffice/downloadODP/?B5163B36F9C7BD6AA12FF2DBD4E1DF19>
- SDa, autoriteit diergeneesmiddelen. 2020. Rapport 'Het gebruik van antibiotica bij landbouwhuisdieren in 2019.' [https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergeneesmiddelen/userfiles/sda%20jaarrapporten%20ab-gebruik/ab-rapport-2019/sda-rapport-het-gebruik-van-antibiotica-bij-lhd-in-2019-\(1\).pdf](https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergeneesmiddelen/userfiles/sda%20jaarrapporten%20ab-gebruik/ab-rapport-2019/sda-rapport-het-gebruik-van-antibiotica-bij-lhd-in-2019-(1).pdf)

- GD Deventer, 2017. Rapport van het project 'Bedrijfskenmerken, bedrijfsinrichting, diergezondheid en factoren in kennis – houding – gedrag op zeugen- en vleesvarkensbedrijven met een laag versus een hoog antibioticumgebruik'. <https://edepot.wur.nl/430324>
- KNMvD, 2017. Richtlijn Streptococcus suis bij gespeende biggen. <https://www.knmvd.nl/app/uploads/2018/07/RICHTLIJN-STREPTOCOCCUS-SUIS-DEF-APRIL-2014.pdf>
- Guavarra, R.B., Lee, J.H., Lee, S.H., Seok, M.J., Kim, D.W., Kang, B.N. et al. 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2019) 10:1.
- Virdi, V., Palaci Bataller, J., Laukens, B., Ryckaert, S., Cox, E., Vanderbeke, E., Depicker, A., Callewaert, N. 2019. Yeast-secreted, dried and food-admixed monomeric IgA prevents gastrointestinal infection in a piglet model. *Nature Biotechnology* 37(5), 527–530.
- Virdi, V., Coddens, A., De Buck, S., Millet, S. et al. 2013. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Proc Natl Acad Sci* 110(29):11809-14.
- Dubreuil, J.D. 2017. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know?. *Biosci Microbiota Food Health*. 36(3):75-90. doi:10.12938/bmfh.16-030
- Wang, J., Zeng Y., Wang S., Liu, H., Zhang, D., Zhang, W., Wang, Y., Ji, H. 2018. Swine-Derived Probiotic *Lactobacillus plantarum* Inhibits Growth and Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Mediates Host Defense. *Front. Microbiol.* 9.
- Zhang W, Zhu Y-H, Zhou D, Wu Q, Song D, Dicksved J, Wang J-F. 2017. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function following *Escherichia coli* challenge in newly weaned pigs of genotype MUC4 that are supposed to be enterotoxigenic *E. coli* F4ab/ac receptor negative. *Appl Environ Microbiol* 83:e02747-16
- Jiménez, M.J., Berrios, R., Stelzhammer, S., Hohmann, M., Verri Jr. W. et al. 2020. Ingestion of organic acids and cinnamaldehyde improves tissue homeostasis of piglets exposed to enterotoxic *Escherichia coli* (ETEC). *Journal of Animal Science*:1–11.
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., & Mills, D. A. 2015. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0091-8>
- Suiryanrayna, M.V., Ramana, J.A. 2015. Review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J Animal Sci Biotechnol* 6, 45.
- Tsiloyiannis VK, Kyriakis SC, Vlemmas J, Sarris K. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res Vet Sci*. 70(3):287-93.
- 5.1 lid26, 5.1 lid27 van Oostrum M, Pérez JF, Mateos GG, Nyachoti CM, van der Aar PJ. 2014. Relevance of functional properties of dietary fibre in diets for weaning pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 189:1–10.
- Bass, Benjamin Edward. 2012. Influence of Nutritional Modifications on Sow, Litter, and Nursery Performance. Theses and Dissertations.
- De Vries, H., M. Geervliet, C.A. Jansen, V.P.M.G. Rutten, H. van Hees, N. Groothuis et al. 2020. Impact of Yeast-Derived  $\beta$ -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. *Microorganisms* 8, 1573
- Amass, S.F., Clark, L.K., Knox, K., Wu, C.C., Hill, M.A. *Streptococcus suis* colonization of piglets during parturition. *Swine Health Prod.* 1996;4:269–272.
- Dekker, N., Bouma, A., Daemen, I., Klinkenberg, D., van Leengoed, L., Wagenaar, J.A. et al. 2013. Effect of Spatial Separation of Pigs on Spread of *Streptococcus suis* Serotype 9. *PLoS ONE* 8(4): e61339.
- Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci* 34:31-67.
- Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *J Anim Sci Biotechnol*. 2020;11:44.
- Dierick N, Decuyper J, Molly K, Van Beek E, Vanderbeke E. 2002. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. *In vitro* screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livest Prod Sci*. 75:129–142.
- Trevisi P, Colombo M, Priori D, Fontanesi L, Galimberti G, Calò G, Motta V, Latorre R, Fanelli F, Mezzullo M, Pagotto U, Gherpelli Y, D'Inca R, Bosi P. 2015. Comparison of three patterns of feed supplementation with live *Saccharomyces cerevisiae* yeast on postweaning diarrhea, health status, and blood metabolic profile of susceptible weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4ac. *J Anim Sci*. 93(5):2225-33.
- Trevisi, P., Latorre, R., Priori, D., Luise, D., Archetti, I., Mazzoni, M., D'Inca, R., Bosi, P. 2017. Effect of feed supplementation with live yeast on the intestinal transcriptome profile of weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4. *Animal*, 11(1), 33-44.
- Cheng, C., Hongkui Wei, Chuanhui Xu, Xiaowei Xie, Siwen Jiang, Jian Peng. 2018. Maternal Soluble Fiber Diet during Pregnancy Changes the Intestinal Microbiota, Improves Growth Performance, and Reduces Intestinal Permeability in Piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (17) e01047-18
- Feyera T, Højgaard CK, Vinther J, Bruun TS, Theil PK. Dietary supplement rich in fiber fed to late gestating sows during transition reduces rate of stillborn piglets. *J Anim Sci*. 2017 Dec;95(12):5430-5438.
- Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci*. 90(8):2581-9.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology & medicine*, 49(11), 1603–1616.
- Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME. 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol*. 244(1):77-83.
- 5.1 lid28 Ferrando ML, van Baarlen P, Orrù G, et al. 2014. Carbohydrate availability regulates virulence gene expression in *Streptococcus suis*. *PLoS One*. 2014;9(3):e89334.
- Furness JB, Kunze WA, Clerc N. 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol*. 277(5):G922-8.
- Vighi, G., Marcucci, F., Sensi, L., Di Cara, G., & Frati, F. 2008. Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and experimental immunology* 153, Suppl 1, 3–6.
- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. 2010. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. 16(2):228-31.
- Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y. 2008. Commensal DNA Limits Regulatory T Cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses. *Immunity* 29(4): 637-649.
- Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C. 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis*. 48(5):617-25. PMID: 19191650.
- Smith K., McCoy K. D., Macpherson A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59–69
- Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(5):313-23.



- San Andres, J.V., Gabriel A Mastromano, Yanshuo Li, Huyen Tran, Justin W Bundy, Phillip S Miller, Thomas E Burkey. 2019. The effects of prebiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs, *Translational Animal Science* 3:1315–1325.
- Chen, F., Houjun Wang, Jiayi Chen, Yang Liu, Wei Wen, Yinghui Li, Xingguo Huang. 2020. *Lactobacillus delbrueckii* Ameliorates Intestinal Integrity and Antioxidant Ability in Weaned Piglets after a Lipopolysaccharide Challenge. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 6028606, 10 pages.
- Bergeron, N., Robert, C., Guay, F. 2014. Feed supplementation with arginine and zinc on antioxidant status and inflammatory response in challenged weanling piglets. *Animal Nutrition* 3(3):236-246.
- Pi D, Liu Y, Shi H, Li S, Odle J, Lin X, et al. 2014. Dietary supplementation of aspartate enhances intestinal integrity and energy status in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge. *J Nutr Biochem*. 25:456–62.
- Pantano C., Reynaert N. L., van der Vliet A., and Janssen-Heininger Y. M.. 2006. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal*. 8:1791–1806.
- Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S.K. 2012. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *J Nutr* 142(11):2017-24.
- Waititu, S.M., J.M. Heo, R. Patterson, C.M. Nyachoti. 2016. Dietary yeast-based nucleotides as an alternative to in-feed antibiotics in promoting growth performance and nutrient utilization in weaned pigs. *Can J Anim Sci*, 96:3.
- Wu, C., Xu, Q., Wang, R., Qing, L., Peng, X., Hu., L., Liu, Y. et al. 2018. Effects of dietary  $\beta$ -glucan supplementation on growth performance and immunological and metabolic parameters of weaned pigs administered with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Food Funct*. 9, 3338–3343.
- Moya, S.L., Boyle, L., Lynch, P.B., and Arkins, S. 2006. Pro-inflammatory cytokine and acute phase protein responses to low-dose lipopolysaccharide (LPS) challenge in pigs. *Animal Science* 82: 527–534
- Nordgreen, J., Munsterhjelm, C., Aae, F., Popova, A., Boysen, P. et al. 2018. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on inflammatory markers in blood and brain and on behavior in individually-housed pigs. *Physiology & Behavior* 195:98-111.
- Carroll, J.A., Carter, D.B., Korte, S.W., Prather, R.S. 2005. Evaluation of the acute phase response in cloned pigs following a lipopolysaccharide challenge. *Domest Anim Endocrinol* 29(3):564-72.
- Williams et al, 2009. Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 37(3):139-147.
- Terenina, E., Valérie Sautron, Caroline Ydier, Darya Bazovkina, Amélie Sevin-Pujol, et al. 2017. Time course study of the response to LPS targeting the pig immune gene networks. *BMC Genomics, BioMed Central* 18, ff10.1186/s12864-017-4363-5ff.
- Kadiiska MB, Peddada S, Herbert RA, et al. 2015. Biomarkers of oxidative stress study VI. Endogenous plasma antioxidants fail as useful biomarkers of endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 81:100-106.
- Hou X, Zhang J, Ahmad H, Zhang H, Xu Z, et al. (2014) Evaluation of Antioxidant Activities of Ampelopsin and Its Protective Effect in Lipopolysaccharide Induced Oxidative Stress Piglets. *PLoS ONE* 9(9): e108314.
- Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. 2017. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 3(4):313-321.
- AgroVision, 2020. *Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari-december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.*
- Knecht D, Cholewińska P, Jankowska-Mąkosa A, Czyż K. 2020. Development of Swine's Digestive Tract Microbiota and Its Relation to Production Indices-A Review. *Animals (Basel)*10(3):527.
- Buchet A, Belloc C, Leblanc-Maridor M, Merlot E. 2017. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PLoS ONE* 12(5): e0178487.
- Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., Klünter, A. 2019. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250: 9-31.
- Lallès J-P and Fagerhol MK 2005. Faecal calprotectin: a non-invasive marker of inflammation in pigs? *ISAH* 1, 405–408.
- Lemoine N., Fautrel A. Têcher M., Guillou D., 2018. Validation of a quantitative biomarker of gut inflammation in weaned piglets. 14th International Symp. Digest. Physiol. Pigs, Brisbane, Australia.
- Rubio, C.P., Mainau, E., Cerón, J.J. et al. 2019. Biomarkers of oxidative stress in saliva in pigs: analytical validation and changes in lactation. *BMC Vet Res* 15, 144.

## 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

### Doelstelling

De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen. Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en *E. coli* en *S. suis* infecties te verminderen.

Uiteindelijk doel:

Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale [5.1 lid2h](#). Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.



Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Hieronder vallen drie subdoelen:

het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:

- het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen
- het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen
- de immuun competentie van gespeende biggen

### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De doelstellingen zijn realistisch en haalbaar, omdat:

- alle expertise die nodig is beschikbaar is op 5.1 lid2h . 5.1 lid2h waar de proeven worden uitgevoerd is een onafhankelijk 5.1 lid2h voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvragen te beantwoorden. Beschikbare expertises zijn kennis van fysiologie, (darm)gezondheid, microbiologie, grondstoffen, voederwaardering, nutritionele behoeften en gedrag. Het personeel is deskundig en de onderzoekers in dienst hebben een Ir-, MSc-, DVM- of PhD-titel. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan de projecten, waardoor voortgang en kwaliteit van het project is gewaarborgd.
- de doelstelling is gebaseerd op voorgaand onderzoek in varkens door 5.1 lid2h en anderen (review over E. coli en LPS modellen: Adewole et al., 2016).
- 5.1 lid2h veel ervaring heeft opgebouwd met het uitvoeren van dit type onderzoeksprojecten. Dit is namelijk een vervolgpjectaanvraag, als vervolg van vergunning AVD5.1 lid2h . De modellen zijn de afgelopen jaren doorontwikkeld, waarbij er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie wordt gevonden (E. coli en S. suis kolonisatie model) of een duidelijke immuunrespons (LPS immuun competentie model) met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen en ongerief (Luise et al., 2019). Zo is de wijze van besmetting met S. suis ingewikkeld, maar door 5.1 lid2h doorontwikkeld tot een werkend model door verschillende inoculatiemethoden te testen. Ook voor E. coli heeft 5.1 lid2h na uitvoerige studie en testen een voldoende geconcentreerd en functioneel E. coli inoculum ontwikkeld. Daarnaast hebben we het droge stof gehalte van mestmonsters bepaald om het mest consistentie protocol objectiever te maken en te kunnen vergelijken met andere 5.1 lid2h Qua ziekteverschijnselen onderscheiden de 'kolonisatie' modellen van 5.1 lid2h zich van E. coli en S. suis 'infectie' modellen in de literatuur voor wat betreft de mortaliteit ten gevolge van de inoculatie (o.a. Becker et al., 2020; Pallarés et al., 2003) welke we hebben kunnen reduceren met behoud van een goed resultaat voor wat betreft effectiviteit van het model. Daarnaast is uit onderzoek tijdens de afgelopen jaren binnen 5.1 lid2h gebleken dat het zeer zinvol kan zijn om invloed uit te oefenen op de gezondheid van biggen door middel van voerstrategieën en voeradditieven bij de zeugen (met name rondom werpen), omdat biggen via de zeug al besmet kunnen worden met E. coli of S. suis. Om deze reden worden ook de zeugen benoemd in dit project en in de uitvoering van het onderzoek.
- samengewerkt wordt met nationale en internationale onderzoeksinstellingen in projecten waarbij zowel universiteiten als private bedrijven betrokken zijn zodat geavanceerde technieken op efficiënte wijze gebruikt kunnen worden. Deze kennis is vervolgens beschikbaar voor de klanten (5.1 lid2h ). 5.1 lid2h bedient meer 5.1 lid2h op inhoudelijke kennis op grondstoffen gebied en voorlichting. Op deze manier draagt 5.1 lid2h bij aan de ambitie 'kennis, leervermogen en innovatie' ter verduurzaming van de Nederlandse veehouderij (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij, 2013). Op wereldwijd niveau bedient 5.1 lid2h op moment van schrijven 5.1 lid2h Dit betekent dat de (hier) gegenereerde kennis er voor zorgt dat de gezondheids- en welzijnsstandaard in grote stappen naar een hoger niveau kan worden gebracht via het netwerk, wat ook belangrijk is voor verduurzaming van de Nederlandse veehouderij.

#### Referenties

- Adewole DI, Kim IH, Nyachoti CM. Gut Health of Pigs: Challenge Models and Response Criteria with a Critical Analysis of the Effectiveness of Selected Feed Additives - A Review. Asian-Australas J Anim Sci. 2016;29(7):909-924.
- Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., Trevesi, P. 2019 Methodology and application of Escherichia coli F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. Journal of Animal Science and Biotechnology (2019) 10:53.

Becker, S.L., Li, Q., Burrough, E.R., Kenne, D., Sahin, O., Gould, S.A., and Patience, J.R. 2020. Effects of an F18 enterotoxigenic Escherichia coli challenge on growth performance, immunological status, and gastrointestinal structure of weaned pigs and the potential protective effect of direct-fed microbial blends. Journal of Animal Science 98: 1–10

Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Schmitt, C.S., Roth, J.A., Opriessnig, T. et al. 2003. Comparison of experimental models for Streptococcus suis infection of conventional pigs. The Canadian Journal of Veterinary Research 67: 225-228.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

### 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

#### Wetenschappelijk belang

Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbioom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.

#### Maatschappelijk belang

E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

- Zeugen en biggen

Met behulp van effectieve voerstrategieën en voeradditieven bij zeugen en biggen kan de gezondheid en het welzijn van jonge biggen verbeterd worden. Wanneer voerconcepten bij de zeugen getest worden, wordt er geen of een positief effect verwacht omtrent de gezondheid en het welzijn van de zeugen.

- 5.1 lid2h

Het belang van 5.1 lid2h is dat zij hun voerstrategieën en voerconcepten kunnen verbeteren zodat zij hun klanten, de varkenshouders, beter kunnen adviseren met betrekking tot gezondheid en welzijn van hun biggen en daarmee een vermindering van ziekte en antibioticumgebruik.

- Consument

Preventie van infectieuze aandoeningen en verbetering van de werking van het immuunsysteem zal leiden tot een verminderd antibioticumgebruik, minder resistentievorming voor antibiotica en minder besmettingen van mensen met S. suis en daardoor minder risico's voor de volksgezondheid.

- Varkenshouders

Varkenshouders kunnen hun beroep met de meeste voldoening en de beste kosten-efficiëntie uitoefenen indien zij voorzien worden van actuele kennis met betrekking tot voeding en gezondheid van hun dieren. Daarbij dienen zij de gezondheid van hun dieren te waarborgen binnen de milieu-wetgeving. Het sparen van het milieu en het waarborgen van de gezondheid van hun dieren staan regelmatig op gespannen voet, daarom is praktijkgericht onderzoek en advies m.b.t. dit onderwerp van groot belang. Daarnaast zijn veehouders in nauw contact met hun dieren en aangezien S. suis een ziekte is waarvoor zij gevoelig zijn hebben zij er belang bij dat ziekte door deze bacterie wordt voorkomen.

- Leveranciers van (voer)additieven

Het belang van leveranciers van voeradditieven is dat zij de effectiviteit van hun producten kunnen aantonen voor wat betreft preventie van bacteriële aandoeningen en werking van het immuunsysteem.

- Milieu

De milieuwetgeving wordt voor de varkenshouderij strenger. Het verminderen van het gebruik van hoge doseringen aan koper en zink is ongewenst en slecht voor het milieu. Indien de gezondheid van varkens verbeterd kan worden zonder grote hoeveelheden van deze mineralen te voeren is dit winst voor het milieu.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Het doel van het project is het optimaal ondersteunen van de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen ziektes. [De strategie begint met het uitgebreid verzamelen van informatie over de achtergrond en het werkingsmechanisme van het voeradditief. Deze informatie wordt gezocht in de literatuur, gebaseerd op kennis en ervaring binnen 5.1 lid2h](#), en gebaseerd op informatie, zoals onderzoek, van de toeleverancier. Het doel van deze zogenaamde 'voorstudie' is om duplicatie te voorkomen en antwoorden te vinden op de vragen van het selectieproces, zie hieronder. Dit selectieproces waarborgt dat alleen relevante voedingsinterventies ingezet worden in het onderzoek onder dit project.

Voorafgaand aan iedere proef binnen dit project worden de volgende vragen gesteld om te bepalen of de proef uitgevoerd zal worden:

- Omvat de proef het testen van een voeradditief of voer(productie)strategie?
- In het geval van het testen van een voeradditief, is het additief *in vitro* of voor andere doelstellingen of bij andere diersoorten getest met positief resultaat?
- Kan de kennis die met de aanvraag wordt verkregen op Nederlands en Europees niveau worden toegepast?

Als op 1 of meerdere van bovenstaande vragen 'nee' geantwoord wordt, zal de proef niet plaatsvinden.

Als op alle bovenstaande vragen 'ja' geantwoord is zullen de volgende vragen gesteld worden om tot de beste proefopzet te komen:

- Wat is de achtergrond van het voeradditief of de voer(productie)strategie?
- Wat is het werkingsmechanisme van het voeradditief of de voer(productie)strategie; is het gericht op *E. coli*, óf *S. suis* óf het moduleren van het immuunsysteem?
- Zijn er aanvullende monsters nodig om de onderzoeksvraag te beantwoorden? Zo ja, welk type en welke frequentie van bemonstering is nodig?
- In het geval van een voeradditief, hoe dient het additief verwerkt te worden (bijv. gepelleteerd voer, ongepelleteerd voer, drinkwater) en in welke dosering(en)?

In varkensvoerders worden regelmatig meerdere additieven tegelijkertijd gebruikt. De werking van additieven hoeft niet altijd elkaar versterkend te zijn; zo kunnen producten een overlappend werkingsmechanisme hebben, of een tegenstrijdig effect (bijvoorbeeld een combinatie van organische zuren en probiotica). Daarom kunnen in proeven binnen dit project combinaties van voeradditieven binnen één behandeling worden getest om dit effect te onderzoeken.

[In het geval van voerstrategieën in het voer van zogende biggen zal er een go-no go beslissing plaatsvinden op spenen. Hierbij is het namelijk van belang dat biggen het voer vóór het spenen hebben gegeten om effecten van de voerstrategie te zien. Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.](#)

Binnen dit project worden drie modellen gebruikt die een verschillend onderdeel van de gezondheid belichten. De strategieën zullen in één van deze modellen worden getest, omdat deze specifiek op een onderdeel van de gezondheid werken en het dus niet zinnig is om het product in meerdere modellen te testen. Het effect van voerstrategieën en voeradditieven op de kolonisatie van *E. coli* zal worden bestudeerd in het *E. coli* kolonisatie model (**Bijlage 1**), waar het effect op de kolonisatie van *S. suis* bestudeerd zal worden in het *S. suis* kolonisatie model (**Bijlage 2**). Wanneer het product geen specifieke werking heeft tegen *E. coli* of *S. suis*, maar (de ontwikkeling van) het immuunsysteem kan beïnvloeden, wordt het LPS immuun competentie model ingezet (**Bijlage 3**).

Om de doelstelling van dit project te behalen voert **5.1 lid2h** toegepast onderzoek uit, zowel collectief onderzoek (op thema basis) als individueel contractonderzoek.

**Het collectief onderzoek.** Onderzoek dat uitgevoerd wordt voor collectieven van **5.1 lid2h** hebben veelal als doel voerconcepten te ontwikkelen, waarin voeradditieven en voer(productie)strategieën op de meeste effectieve wijze kunnen worden ingezet om de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen ziektes optimaal te ondersteunen. De opzet en uitvoering van het onderzoek wordt vastgesteld door onderzoekers gezamenlijk met een wetenschappelijk team, consultants en een afvaardiging (nutritionisten en R&D) uit het collectief van **5.1 lid2h** om de relevantie en toepasbaarheid voor de praktijk te garanderen. Onderzoeksresultaten worden besproken met deze zelfde afvaardiging en vervolgens breed gedeeld aan alle **5.1 lid2h** in het collectief (zie **Figuur 2**). Er wordt ook samengewerkt met verschillende (internationale) onderzoeksinstituten. Op het moment van schrijven wordt er in een EU-project met 13 partners uit 9 Europese landen samengewerkt aan **5.1 lid2h** als alternatief voor het gebruik van antimicrobiële middelen, specifiek tegen spendediarree door E. coli. Ook werkt **5.1 lid2h** op het moment van schrijven samen met **5.1 lid2h** om S. suis infecties bij biggen te verminderen.

**Figuur 2.** Diverse stadia van het collectief onderzoek. Onder onderzoekers worden de onderzoekers **5.1 lid2h** verstaan.



**Het contractonderzoek** bestaat voornamelijk uit onderzoek naar de effectiviteit van voeradditieven en voer(productie)strategieën in biggen. Dit betreft producten die ontwikkeld worden door toeleveranciers van **5.1 lid2h** of specifieke vragen van hen over het effect van bepaalde factoren (bijv. voerproductie). Samen met de R&D-afdeling van de opdrachtgever wordt door de onderzoekers een proefopzet vastgesteld.

### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Het onderzoek dat wordt uitgevoerd voor een collectief van **5.1 lid2h**, is onderzoek dat gewenst en nuttig is voor nationale en internationale **5.1 lid2h**. Omdat onderzoeken voor deze vaste klanten als basis dienen voor vervolgonderzoek, wordt de verkregen kennis optimaal benut. **5.1 lid2h** bedient meer dan 95% van de Nederlandse **5.1 lid2h** op inhoudelijke kennis op grondstoffen gebied voorlichting. Op wereldwijd niveau bedient **5.1 lid2h** op moment van schrijven 10% van de **5.1 lid2h**. Dit betekent dat de (hier) gegenereerde kennis er voor zorgt dat de gezondheids- en welzijnsstandaard in grote stappen naar een hoger niveau kan worden gebracht via het netwerk. De **5.1 lid2h** zijn tevens de belangrijkste adviseurs op voergebied van de veehouders. Daarom heeft dit onderzoek veel invloed op de kennis en toegepaste strategie van veehouders met betrekking tot het voeren van varkens zodat deze dieren gezond blijven en het gebruik van antibiotica en mineralen kan worden gereduceerd waardoor het milieu niet teveel belast wordt. **5.1 lid2h** werkt daarnaast nauw samen met kennis- en onderzoeksinstituten binnen Nederland en daarbuiten die

kennis genereren en ontwikkelingen monitoren op het gebied van bijvoorbeeld de gezondheid van dieren en diagnostische technieken. Hierdoor kunnen resultaten en waarnemingen zeer efficiënt worden gebruikt om de doelstellingen te bereiken.

Het contractonderzoek wordt uitgevoerd voor klanten die veelbelovende (voer)additieven willen onderwerpen aan onderzoek zodat deze producten op de markt kunnen worden ingezet. Door via literatuuronderzoek en / of eerder onderzoek een goede voorbereidende studie te doen naar werkingsmechanismes van de additieven wordt het onderzoek zo effectief mogelijk opgezet. Het onderzoek wordt daarom wel als op zichzelf staand onderzoek uitgevoerd, maar reeds bekende resultaten uit eerder onderzoek bij een zelfde type product worden zo zorgvuldig mogelijk meegenomen bij het opzetten van het onderzoek.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen
2	Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen
3	Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

Volgnummer	Titel dierproef
1	Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.



## Inleiding

Escherichia coli (E. coli) infectie is de meest gestelde diagnose voor maagdarmaandoeningen bij varkens. Zoals omschreven in het projectvoorstel, zijn biggen extra gevoelig voor E. coli infecties na het spenen, omdat de darm microbiota dan uit balans raakt en de darmintegriteit afneemt, waardoor E. coli makkelijker kan koloniseren. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en vaccins die ingezet worden in de praktijk.

Omdat uit onderzoek van 5.1 lid2h en de literatuur is gebleken dat biggen met speendiarree al kunnen verschillen in hun darm microbiota vóór het spenen, worden de voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage niet alleen toegepast in het voer voor gespeende biggen, maar kunnen deze ook verstrekt worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen.

In deze laatste gevallen kunnen de langere termijn effecten van deze strategieën op speendiarree onderzocht worden. In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op het verloop van E. coli kolonisatie. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden. Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën worden ontwikkeld voor de praktijk om zo de (darm)gezondheid, en daarmee het welzijn, van varkens te verbeteren (minder diarree en sterfte), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica en zink te verminderen.

## Experimentele aanpak

Bij het veroorzaken van ziekte spelen aanhechtingsfactoren (zoals bijv. F4) en specifieke toxines, zoals hitte labiel/stabiel toxine, een belangrijke rol. De E. coli stammen op 5.1 lid2h zijn gekarakteriseerd op deze kenmerken, zodat het onderzoek uitgevoerd wordt met een voor de praktijk relevante E. coli stam. De afgelopen jaren is uit onderzoek op 5.1 lid2h gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen de darm kolonisatie van biggen in de kraamstal beïnvloed kan worden, welke vervolgens een grote rol spelen in gezondheid van biggen na spenen. Naast voeding van zeug en biggen voor spenen, speelt ook de (abrupte) voerovergang op het moment van spenen een rol in het risico op E. coli kolonisatie na het spenen, waardoor het belangrijk kan zijn onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom wordt onderzoek gedaan met proefopzetten waarin de voeding van de zeug, de zogende big en/of de gespeende big een rol kan spelen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethoden

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)		
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gepeende biggen		Inoculatie E. coli gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van inoculatie	Gebruik antibioticum <sup>c</sup>
1	Ja				Ja	Dag 4	Nee
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4	Nee
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4	Nee
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-14	Nee
5			Ja		Ja	Dag 4-14	Ja

<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in de kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van inoculatie is afhankelijk van de lengte van de proefvoeradaptatieperiode van het testproduct

<sup>c</sup> Antibioticum behandeling t.b.v. [standaardisatie E. coli in het maagdarkanaal van de biggen](#)

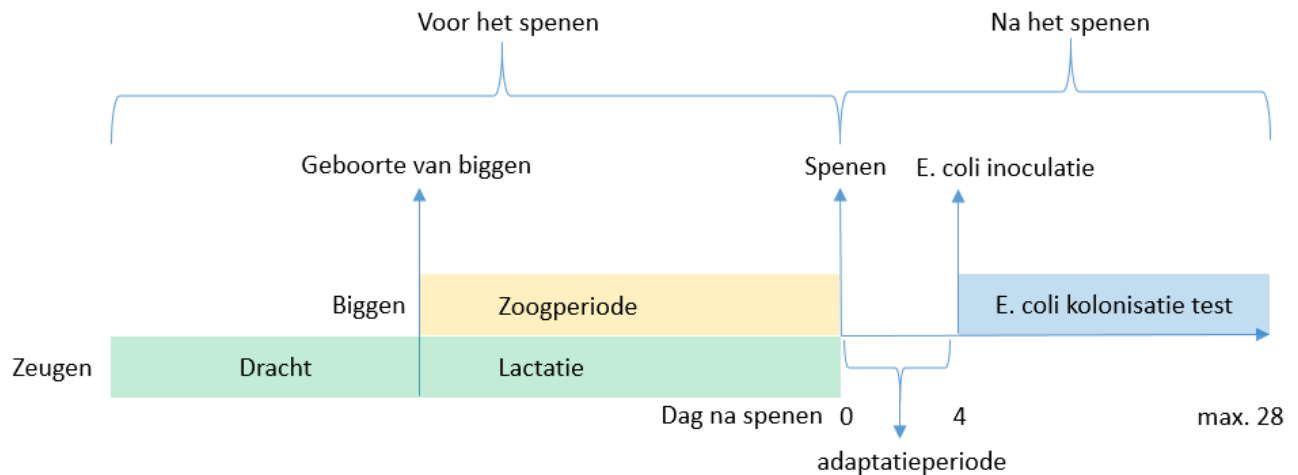
**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op E. coli kolonisatie na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te inoculeren na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab wordt bepaald of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen. [Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.](#)

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnoculeerd worden met E. coli op dag 4 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnoculeerd kunnen worden met E. coli. Het moment van inoculeren is dus flexibel, maar wel altijd tussen 4 en 14 dagen na het spenen.



**Ad c.** Bij methode 5 wordt uitsluitend naar het effect van de proefbehandeling bij gespeende biggen gekeken. Daarom worden de biggen voor wat betreft aanwezigheid van *E. coli* in het maag-darmkanaal zoveel mogelijk gestandaardiseerd met behulp van een antibioticumkuur om mogelijke zeugen effecten te verminderen.

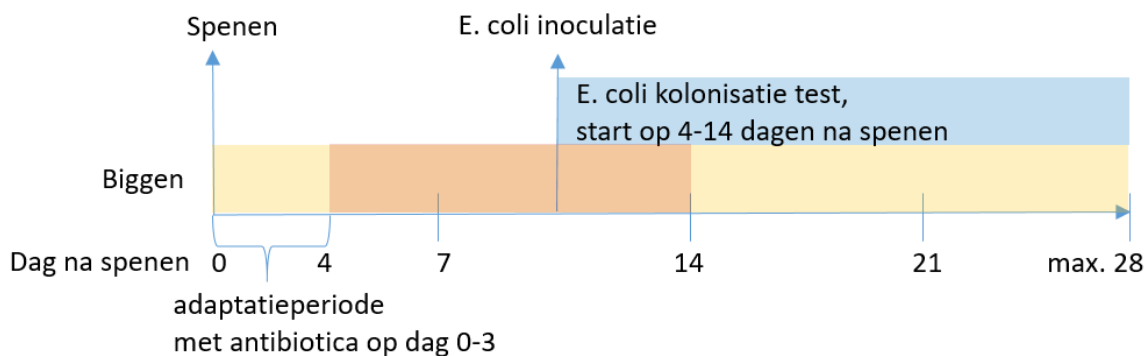
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnoculeerd met *E. coli*.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen, worden behandeld met een smalspectrum antibioticum. De gespeende biggen worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waarna de biggen geïnoculeerd worden met *E. coli*. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de *E. coli* inoculatie kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

## **Algemeen**

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waardoor de E. coli kolonisatie test zal starten op 4-14 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de E. coli kolonisatie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### E. coli kolonisatie test (uitscheiding van E. coli bestuderen)

De E. coli kolonisatie test start met het oraal inoculeren van de biggen met een mild pathogene E. coli stam. Vervolgens zal de uitscheiding van E. coli in de mest en de mestconsistentie van individuele biggen bestudeerd worden. Omdat in de praktijk de ziekteverschijnselen als gevolg van E. coli met name optreden in de eerste twee weken na spenen (van 4 tot 6 weken leeftijd), start de E. coli kolonisatie test binnen deze leeftijdscategorie. Dit is van belang omdat het immuunsysteem en maagdarmkanaal met darmmicrobioom van de biggen op die leeftijd nog volop in ontwikkeling is, en leeftijd daarom een belangrijke rol speelt in de effecten die gevonden zullen worden. De dieren in de proef zijn dan wat betreft ontwikkelingsstadium zoveel mogelijk gelijk zijn aan de dieren onder praktijkomstandigheden.

## **Uitkomstparameters**

De primaire uitkomstparameters in de E. coli kolonisatie test zijn:

1. De uitscheiding van E. coli in de mest
2. De mestconsistentie
3. De immunstatus
4. Het darmmicrobioom

De uitscheiding van E. coli in de mest en de mestconsistentie zijn de meest belangrijke parameters aangezien het in het hier beschreven onderzoek gaat om het bepalen van de afweer van biggen tegen speendiarree veroorzaakt door E. coli. Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte en medische behandelingen).

Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen omtrent de immunstatus en het darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

---

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### Inoculatie met E. coli bacteriën:

De E. coli kolonisatie test start door een bekende dosis van een mild pathogene stam van E. coli bacteriën oraal in de bek van de gespeende big te spuiten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 5 minuten
Frequentie:	1 x
Wijze:	Oraal met een spuitje in de bek

### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen, het bepalen van de uitscheiding van E. coli, het bepalen van de mestconsistentie en eventuele aanvullende parameters zoals het darmmicrobioom of vluchtige vetzuren zijn verse mestmonsters of rectale swabs nodig. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 15 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

**Onderbouwing:** De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en omvat het nemen van een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Voor het bepalen van de mestconsistentie en de uitscheiding van E. coli bij gespeende biggen is het niet mogelijk om mestmonsters vanaf de vloer te verzamelen, omdat bacteriën zich vermenigvuldigen na uitscheiding, waardoor er een vertekend beeld kan ontstaan.

Verse mestmonsters kunnen bij zeugen en biggen ook nodig zijn voor andere waarnemingen, zoals vluchtige vetzuren in de mest. Vaak worden de mestmonsters dan tevens gebruikt ter bepaling van het darmmicrobioom. Een rectale swab kan ook gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen en wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Bloedmonsters

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er bloedmonsters verzameld moeten worden.

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 3 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie, hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

**Onderbouwing:** Bloedmonsters worden genomen om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Het is met name van belang om de immuunrespons en darmintegriteit in kaart te brengen (Celi et al., 2019). Zo brengen toxines geproduceerd door E. coli een sterke immuunrespons op gang (Cox et al., 2006; Loos et al., 2012) en is er bijvoorbeeld een stijging in acute fase eiwitten en inflammatoire cytokines na E. coli toediening (o.a. Lee et al., 2012). Bloedmonsters kunnen ook vóór E. coli kolonisatie genomen worden om het werkingsmechanisme van voerstrategieën bij de zeugen of zogende biggen te achterhalen of om zeugen of biggen te genotyperen (bijv. MUC13) op gevoeligheid voor E. coli.

### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of en wanneer er monsters na euthanasie verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef, bijv. de helft van de dieren op de piek van E. coli uitscheiding en de helft van de dieren wanneer de E. coli uitscheiding sterk gedaald is. Bij methode 1 t/m 4 kan het bovendien nodig zijn monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit kan noodzakelijk zijn om de uitscheiding van E. coli, het darm microbioom, de pH en korte-keten vetzuren in verschillende segmenten van de darm te bestuderen en om bijvoorbeeld de lokale immuunrespons in de darmwand en darmontwikkeling/morfologie en -integriteit te onderzoeken.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speeksel- of urinemonsters of tonsil swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen, of vaginale swabs van zeugen.

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze speeksel:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen
Wijze urine:	Spontane urinelozing

Onderbouwing:

Dit draagt bij om het werkingsmechanisme van de voerstrategie te bestuderen. Zo kunnen er in speekselmonsters biomarkers voor de gezondheidsstatus bepaald worden, zoals antilichamen, en kunnen urinemonsters ingezet worden om de nutriëntenbenutting, en dus indirect darmgezondheid, te kunnen bestuderen.

### Vaginale swab

Dieren:	Zeugen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 4 x per cyclus

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de vagina. Dit kan relevant zijn, omdat bij de geboorte van biggen hun darm microbiota wordt gevormd door de microbiota van de zeug, inclusief de microbiota in het geboortekanaal.

### Tonsil swab

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Tonsil swabs kunnen worden ingezet om de relatie tussen darm microbiota en tonsil microbiota te onderzoeken. De inzet van probiotica bijvoorbeeld kan mogelijk de hoeveelheid substraat voor E. coli verminderen. Onderzoek van het microbioom van de tonsillen is daarom incidenteel informatief in dit type onderzoek.

### Rectale temperatuur

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	2 x daags
Moment:	Eerste 5 dagen na inoculatie

Onderbouwing: Als responsparameter is de lichaamstemperatuur momenteel nog niet onderkend als een goede voorspeller / indicator van het ziekteverloop van E. coli, omdat het onnauwkeurig kan zijn vanwege waterige uitwerpselen in het rectum, de bewegingen van het dier en stress van het hanteren. Echter, voor monitoring van de gezondheid van de biggen na inoculatie worden de biggen 2 x daags getemperatuur en vaker indien nodig.

### Handelingen die alleen in proeven met uitsluitend gespeende biggen zullen worden uitgevoerd (methode 5 in Tabel 1)

#### Behandeling met een smalspectrum antibioticum

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	3 dagen*

Wijze:	Via het drinkwater
--------	--------------------

#### Onderbouwing:

Op deze wijze wordt de uitscheiding van *E. coli* voor de start van de voerstrategieën gestandaardiseerd en worden mogelijke zeug effecten verminderd.

\*Wanneer verwacht wordt dat de testproducten een vergelijkbaar effect geven op *E. coli* uitscheiding als smalspectrum antibiotica, kan er ook een proefgroep ter vergelijking ingezet worden waarbij de biggen van spenen tot het einde van de proef via het drinkwater behandeld worden met een smalspectrum antibioticum (Luise et al., 2019).

#### Referenties

- Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., Klünter, A. 2019. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250: 9-31.
- Cox E., Verdonck F., Vanrompay D., Goddeeris B. (2006). Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Veterinary Research* 37, 511-539.
- Lee, J.S., Awji, E.G., Lee, S.J., Tassew, D.D., Park, Y.B., Park, K.S., Kim, M.K., Kim, B., Park, S.C. Effect of *Lactobacillus planetarium* CJLP243 on the growth performance of cytokine response of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci.* 2012;90:3709–3717.
- Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., Trevesi, P. 2019 Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2019) 10:53.
- National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.
- Loos, M., Geens, M., Schauvliege, S., Gasthuys, F., van der Meulen, J., Dubreuil, J. D., Goddeeris, B. M., Niewold, T., & Cox, E. (2012). Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS one*, 7(7), e41041.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse, worden gegevens uit eerdere proeven op **5.1 lid2h** of uit de literatuur gebruikt. Uit onze eerdere onderzoeken is gebleken tot 10-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van *E. coli* en in mestconsistentie. Het exacte aantal zeugen en biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	180	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	360	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	900	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van <b>5.1 lid2h</b> .
Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op <i>E. coli</i> besmetting bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari - december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.

Aantal	<u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u> 3 proeven in 5 jaar, 2-8 behandelingen per proef, 10-15 zeugen per behandeling. Gemiddeld 3 proeven x 6 behandelingen x 10 zeugen = 180 zeugen <u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u> 3 proeven per jaar, 2-8 behandelingen per proef, 14-16 biggen per behandeling. 3 proeven x 6 behandelingen x 14 dieren = 252 biggen x 5 jaar = 1260 biggen. Hiervan worden 900 biggen (zowel voor als) na spenen ingezet (3 proeven per jaar x 6 behandelingen x 10 dieren = 180 biggen x 5 jaar = 900 biggen). De andere 360 biggen worden alleen tot spenen gevolgd om biggen te kunnen selecteren die voldoende vast voer hebben opgenomen in de kraamstal.
Geslacht	Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek. Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

### C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voorwerpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. **In de laatste week vóórwerpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.** Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

#### Referenties

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.

Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluivers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, orale inoculatie met E. coli, mestmonsters, bloedafname). Ook fixatie (voor inoculatie en bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens.
- Verwacht wordt dat de dieren milde klinische verschijnselen zullen ontwikkelen na de E. coli inoculatie, waaronder diarree en een verminderde voeropname, gewichtstoename en activiteit (maar wel alert). Matige en ernstige klinische verschijnselen, en dus ook medische behandelingen en uitval, ten gevolge van de inoculatie zijn in voorafgaande proeven niet voorgekomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen).
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de E. coli inoculatie.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat ruime ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren tot minder onrust leidt. Het inoculeren gebeurt door middel van een spuitje in de bek. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt.
- Alvorens oraal E. coli toegediend zal worden aan gespeende biggen, vindt er eerst een adaptatieperiode plaats. Het spenen van biggen kan namelijk stressvol ervaren worden door de gelijktijdige veranderingen die optreden in voer en (sociale) omgeving. Door een adaptatieperiode in te lassen, vindt het toedienen van E. coli plaats op een moment welke minder stressvol is voor de biggen. Hierdoor wordt het risico op ongerief beperkt. Bovendien is dit ook noodzakelijk voor de proefopzet, omdat als de E. coli afweer test direct na spenen uitgevoerd zal worden, de resultaten zeer variabel zullen zijn wegens grote variatie in stress geassocieerd met spenen tussen de dieren.
- Er wordt gebruik gemaakt van een mild pathogene stam van E. coli bacteriën waardoor ernstige ziekteverschijnselen (zoals ernstige uitdrogingsverschijnselen) voorkomen worden. Uit voorgaande proeven op 5.1 lid2h is gebleken dat er geen toename in uitval of medische behandelingen plaatsvindt. Alhoewel sommige biggen kortdurende waterdunne diarree kunnen ontwikkelen, zal de meerderheid van de biggen slechts milde symptomen van E. coli besmetting vertonen (milde diarree / temperatuursverhoging). Biggen worden na inoculatie frequent gecontroleerd (minimaal 2 x daags).

#### E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.



- We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde klinische verschijnselen na E. coli inoculatie. De milde klinische verschijnselen die we verwachten zijn diarree, een verminderde voeropname en verminderde activiteit (maar wel alert). Hoewel er een mild pathogene stam van E. coli gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan E. coli ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. [Om de gezondheid van de biggen na de E. coli inoculatie daarom goed te controleren wordt de individuele mestconsistentie eenmaal daags bepaald, wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten en worden de biggen minimaal driemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 5 dagen na inoculatie. Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor, niet drinken en niet alert zijn, zal de big meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.](#)

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

0-2%

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van E. coli inoculatie, van de bemonsteringen en van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (63% van de dieren). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (37% van de dieren). [Het ontbreken van eetbare hokverrijking is in de ongeriefsclassificatie meegenomen.](#)

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). <a href="#">In <i>in vitro</i> onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen.</a> Ook kunnen <i>in vitro</i> studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.
------------	--

Vermindering	De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op 5.1 lid2h en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.
Verfijning	De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

## I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

[n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Biggen die geïnoculeerd zijn, worden aan het einde van de proef opgeofferd in het kader van de proef of na afloop van de proef gedood in het kader van bioveiligheid (voorkomen van verspreiding van de ingezette E. coli op het onderzoeksbedrijf).

Onderzoek van weefsels en organen na euthanasie zal bij onderzoeksvragen naar het werkingsmechanisme van de strategieën, bijdragen aan de interpretatie van de resultaten: bijvoorbeeld het microbioom in verschillende segmenten van de darm is hierbij van belang.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

In het kader van de bioveiligheid en het welzijn van de andere dieren op het onderzoeksbedrijf zullen dieren die in het kader van de proef geïnoculeerd zijn met E. coli geëuthanaseerd worden. Herplaatsing is om deze reden in de opinie van [5.1 lid2h](#) geen goede optie.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
------------	-----------------

2

Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## Inleiding

Streptococcus suis (S. suis) infectie is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsproblemen bij gespeende biggen. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen de strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en (reeds in de praktijk ingezette) autovaccins. Zoals omschreven in het projectvoorstel, zijn biggen extra gevoelig voor S. suis infecties na het spenen, omdat de afweer van de dieren dan verminderd is door stress van het spenen (o.a. transport stress en verandering in voer), waardoor S. suis makkelijker kan koloniseren. Bovendien ontstaat door de nieuwe groepssamenstelling na het spenen de kans dat een varken besmet met virulente S. suis stam de andere biggen in de groep besmet.

Omdat er uit onderzoek van [5.1 lid2h](#) en de literatuur is gebleken dat S. suis overgedragen kan worden van zeug op big tijdens geboorte en lactatie en tussen biggen onderling zullen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage niet alleen toegepast in het voer voor gespeende biggen, maar kunnen deze ook gegeven worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen. In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op het risico op S. suis kolonisatie. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden. Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën toegepast worden in de praktijk om zo de kolonisatie van S. suis bij gespeende biggen te verminderen, en daarmee het welzijn en de gezondheid van varkens te verbeteren (minder ontstekingen), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica te verminderen. Daarnaast wordt de pathogenese van S. suis tot dusver nog niet volledig begrepen en zal de kennis verworven met proeven in deze bijlage bijdragen om deze beter in kaart te brengen (bijv. rol pariteit zeug, geboorte gewicht biggen).

## Experimentele aanpak

Er is veel diversiteit (verschillende serotypes) binnen S. suis. Niet al deze serotypes worden wereldwijd even vaak aangetroffen en er zijn regionale verschillen in het voorkomen van serotypes. De S. suis stam op [5.1 lid2h](#) is gekarakteriseerd op serotype, zodat het onderzoek uitgevoerd wordt met een voor de praktijk relevante S. suis stam. De afgelopen jaren is uit onderzoek op [5.1 lid2h](#) gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen de tonsil en darm kolonisatie van biggen in de kraamstal beïnvloed kan worden, welke vervolgens een grote rol spelen in gezondheid van biggen na spenen. Naast voeding van zeug en biggen voor spenen, speelt ook de (abrupte) voerovergang op het moment van spenen een rol in het risico op symptomen van S. suis na het spenen, waardoor het belangrijk kan zijn onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom wordt onderzoek gedaan met proefopzetten waarin de voeding van de zeug, de zogende big en/of de gespeende big een rol kan spelen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethodes

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)		
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gespeende biggen		Inoculatie S. suis gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van inoculatie	Hergroeperen / verplaatsen <sup>c</sup> gespeende biggen
1	Ja				Ja	Dag 4	Ja
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4	Ja
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4	Ja
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-21	Ja
5			Ja	Ja	Ja	Dag 4-21	Ja

<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in de kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van inoculatie is afhankelijk van de lengte van de proefvoeradaptatieperiode van het testproduct

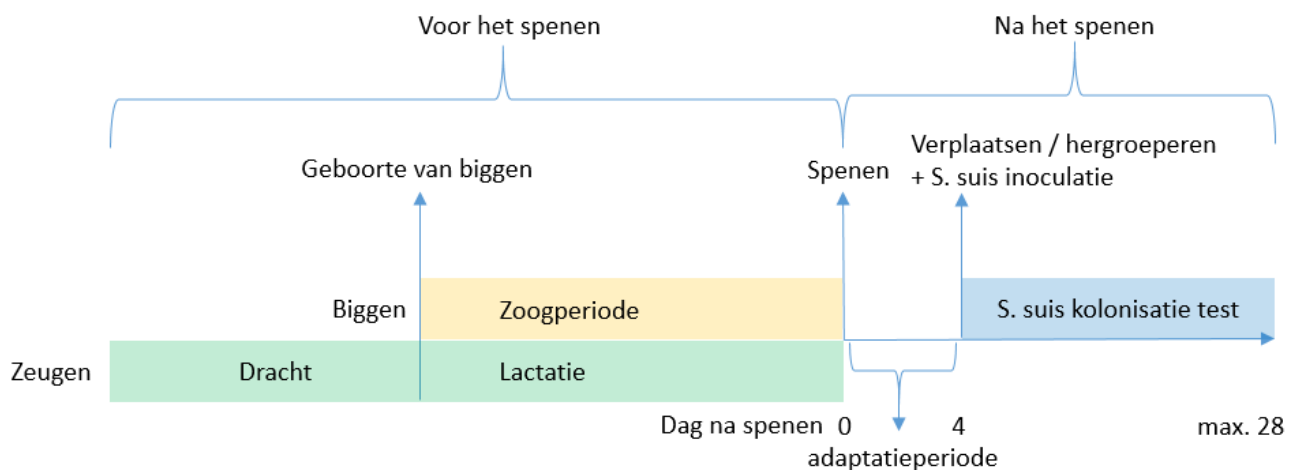
<sup>c</sup> Hergroeperen of verplaatsen van de gespeende biggen zodat S. suis zich beter kan koloniseren

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op S. suis kolonisatie na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te inoculeren na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab kan worden bekeken of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen. **Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.**

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnoculeerd worden met *S. suis* op dag 4 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnoculeerd kunnen worden met *S. suis*. Het moment van inoculeren is dus flexibel, maar wel altijd tussen 4 en 21 dagen na het spenen.

**Ad c.** Om de *S. suis* beter te laten aanslaan worden de biggen voor inoculatie verplaatst en gehergroepeerd. Dit is onderdeel van het model om de haalbaarheid van de proef te vergroten. Zoals in het projectvoorstel is benoemd, is transport een van de factoren die een rol spelen bij het koloniseren van *S. suis*.

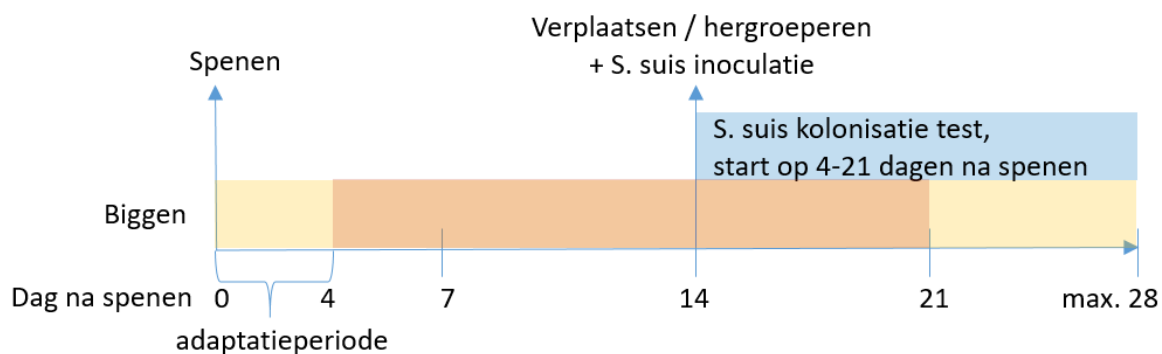
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnoculeerd met *S. suis*.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 3 weken, waarna de biggen geïnoculeerd worden met *S. suis*. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de *S. suis* inoculatie kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

## **Algemeen**

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 3 weken, waardoor de S. suis kolonisatie test zal starten op 4-21 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de S. suis kolonisatie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### S. suis kolonisatie test (uitscheiding van S. suis bestuderen)

- Verplaatsen / hergroeperen:  
Na de adaptatieperiode wordt een verandering in de fysieke en/of sociale omgeving aangebracht. Bijvoorbeeld door de dieren te verplaatsen van de gespeende biggenstal naar de lab faciliteiten. Dit wordt gedaan om de infectie beter te laten verlopen (Swildens et al., 2004; 5.1 lid2h, 5.1 lid2e), aangezien S. suis een korte levensduur heeft en makkelijker kan koloniseren bij een verminderde afweer door stress. Uit voorgaande proeven op 5.1 lid2h blijkt namelijk dat na het verplaatsen en hergroeperen van de biggen S. suis zich gemakkelijker kan koloniseren, waardoor de resultaten van de proef verbeterd worden.
- Inoculatie:  
Op dezelfde dag als deze fysieke en/of sociale omgevingsverandering worden de dieren vervolgens oraal en nasaal geïnoculeerd met een mild pathogene stam van S. suis bacteriën, waarna de uitscheiding van S. suis op de tonsillen bestudeerd zal worden over de tijd. De S. suis kolonisatie test eindigt door de dieren te euthanaseren, waarna de kolonisatie van S. suis in het ileum bestudeerd zal worden. De dieren worden zowel oraal als nasaal geïnoculeerd, omdat uit onderzoek op 5.1 lid2e is gebleken dat inoculatie via enkel de orale route onvoldoende is om de gewenste besmettingsgraad te bereiken. Er is een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen, omdat als de biggen direct na het spenen geïnoculeerd zouden worden met S. suis de resultaten zeer variabel zullen zijn wegens grote variatie in stress geassocieerd met de voerovergang op spenen en wegens grote variatie en lage voeropname de eerste dagen na spenen.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameters in de S. suis kolonisatie test zijn:

1. De kolonisatie van S. suis op de tonsillen
2. De kolonisatie van S. suis in de darminhoud van het ileum

Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte, en medische behandelingen). Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen omtrent de immuunstatus en het tonsil- en darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

---



## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### S. suis kolonisatie test

#### a. Transport + hergroeperen

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	1 uur
Frequentie:	1 x

Onderbouwing: De dieren worden blootgesteld aan transport en hergroepering om een gestandaardiseerd stress moment in te bouwen waardoor de S. suis bacteriën goed aanslaan. Het is een methode die lijkt op de omstandigheden in de praktijk waarvan bekend is dat ze effect hebben op het verloop van de infectie: voor de proef worden deze op een gestandaardiseerde wijze uitgevoerd.

#### b. Inoculatie:

De inoculatie bestaat uit een combinatie van oraal en nasaal inoculeren. Het orale inoculeren gebeurt met behulp van een spuitje in de bek van het dier. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Het nasale inoculeren gebeurt met behulp van een airbrush, waarbij druppels inoculum in de neus van de biggen gesprayd worden, waarna het inoculum verder ingeademd zal worden door de biggen. De orale en nasale inoculatie vinden gelijktijdig plaats.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 5 minuten
Frequentie:	1 x
Wijze:	Oraal met een spuitje in de bek en nasaal met een airbrush

#### Tonsil swabs

In iedere proef zullen tonsil swabs bij de gespeende biggen genomen worden om de kolonisatie van S. suis op de tonsillen te bestuderen. Verder wordt in iedere proef een afweging gemaakt of er ook tonsil swabs nodig zijn bij de zeugen en biggen in de kraamstal.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 12 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Voor het bestuderen van de kolonisatie van S. suis op de tonsillen zijn tonsil swabs nodig. Naast S. suis bacteriën kan ook het gehele tonsil microbioom op deze manier bestudeerd worden om het werkingsmechanisme beter te begrijpen. Door zowel de zeug en haar biggen te bemonsteren kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

#### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef worden monsters na euthanasie verzameld voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef. Bij methode 1 t/m 4 kan het nodig zijn ook monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit is na S. suis inoculatie noodzakelijk voor het bestuderen van de kolonisatie van S. suis in verschillende organen en weefsels, zoals in de darminhoud van de ileum. Naast het bepalen van de S. suis bacteriën in de darminhoud kan ook het totale darm microbioom bestudeerd worden.

#### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen zijn rectale swabs nodig. Verder wordt in iedere proef een afweging gemaakt of er mestmonsters of rectale swabs verzameld moeten worden bij zeugen en/of biggen om de onderzoeksvraag te beantwoorden. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 8 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en omvat het nemen van

een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Verse mestmonsters kunnen nodig zijn om de uitscheiding van *S. suis* via de mest te bepalen. De analyse op *S. suis* bacteriën laat het niet toe om mestmonsters vanaf de vloer te verzamelen, omdat bacteriën zich vermenigvuldigen na uitscheiding, waardoor er een vertekend beeld kan ontstaan. Een vers mestmonster of rectale swab kan ook gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen. Een rectale swab wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters of rectale swabs bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Bloedmonsters

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er bloedmonsters verzameld moeten worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie, hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

Onderbouwing: Bloedmonsters worden genomen voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, bijvoorbeeld om anti-*S. suis* antilichamen in het bloed van biggen, en zeugen (bijv. voor en na vaccinatie), te meten.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speekselmonsters en neus swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen, of vaginale swabs en biest van de zeugen.

#### Speeksel

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen

Onderbouwing: Ter bepaling van biomarkers voor de gezondheidsstatus, bijvoorbeeld antilichamen, of het bepalen van bacteriën in de mondholte.

#### Neus swab

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 10 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de neus. Dit kan relevant zijn, omdat dit de eerste plek is waar luchtweg microben een barrière tegenkomen.

#### Vaginale swab

Dieren:	Zeugen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 4 x per cyclus

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de vagina. Dit kan relevant zijn, omdat bij de geboorte van biggen de microbiota in het geboortekanaal van de zeug van invloed zijn op de ontwikkeling van de darm microbiota van de big.

#### Biest

Dieren:	Zeugen
Frequentie:	1 x, binnen 24 uur na geboorte van de biggen
Wijze:	Met de hand melken

Onderbouwing: Ter bepaling van anti-*S. suis* antilichamen in de biest.

## Rectale temperatuur

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	2 x daags
Moment:	Eerste 4 dagen na inoculatie

### Onderbouwing:

Als responsparameter is de lichaamstemperatuur momenteel nog niet onderkend als een goede voorspeller / indicator van het ziekteverloop van *S. suis*. Echter, voor monitoring van de gezondheid van de biggen na inoculatie worden de biggen 2 x daags getemperatuur en vaker indien nodig.

### Referenties

Choudhury, R., Middelkoop, A., Bolhuis, J. E., & Kleerebezem, M. 2019. Legitimate and Reliable Determination of the Age-Related Intestinal Microbiome in Young Piglets; Rectal Swabs and Fecal Samples Provide Comparable Insights. *Frontiers in microbiology* 10, 1886.

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

Swildens B, Stockhofe-Zurwieden N, van der Meulen J, Wisselink HJ, Nielen M and Niewold TA (2004) Intestinal translocation of *Streptococcus suis* type 2 EF+ in pigs. *Vet Microbiol* 103, 29– 33.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse worden gegevens uit eerdere proeven op 5.1 lid2h of uit de literatuur gebruikt. Uit onze eerdere onderzoeken is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van *S. suis*. Het exacte aantal zeugen en biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	180	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	240	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	600	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van 5.1 lid2h.
Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op <i>S. suis</i> besmetting bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari-december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.

Aantal	<p><u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u>  3 proeven in 5 jaar, 2-8 behandelingen per proef, 10-15 zeugen per behandeling.  Gemiddeld 3 proeven x 6 behandelingen x 10 zeugen = 180 zeugen.</p> <p><u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u>  1-3 proeven per jaar, 3-7 behandelingen per proef, 6-17 biggen per behandeling.  2 proeven x 6 behandelingen x 14 dieren = 168 biggen x 5 jaar = 840 biggen.  Hiervan worden 600 biggen (zowel voor als) na spenen ingezet (2 proeven per jaar x 6 behandelingen x 10 dieren = 120 biggen x 5 jaar = 600 biggen). De andere 240 biggen worden alleen tot spenen gevolgd om biggen te kunnen selecteren die voldoende vast voer hebben opgenomen in de kraamstal.</p>
Geslacht	<p>Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek.</p> <p>Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.</p>
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

### C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. **In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.** Vanwege de rol van het darmmicrobioom op het risico voor *S. suis* infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten, of in de gespeende biggenstal (in groepen van 6 biggen per hok) van **5.1 lid2h** waarna ze vóór *S. suis* inoculatie naar de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) zullen verhuizen. De *S. suis* kolonisatie test vindt dus altijd plaats in de lab faciliteiten. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur.

De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voordoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, het minimale bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de *S. suis* bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van twee niet-eetbare speeltjes, waarvan één dagelijks wordt gewisseld met een ander speeltje.

#### Referenties

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170051.

Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluivers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, inoculatie met S. suis, tonsil swabs, bloedafname, mestmonsters). Ook fixatie (voor inoculatie en bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens. De gespeende biggen worden ook blootgesteld worden aan transport, verplaatsen en/of hergroeperen om kolonisatie van S. suis te faciliteren.
- De S. suis kolonisatie test zal leiden tot milde tot matige ziekteverschijnselen, zoals een kortdurende verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte gewrichtsontsteking. We verwachten op basis van voorgaande proeven geen toename in medische behandelingen of uitval.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen, transport, verplaatsen). Sociale interacties kunnen toenemen als gevolg van nieuwe hokgenoten, wat tijdelijk enige agressie zal oproepen wegens het bepalen van een nieuwe dominantie hiërarchie.
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de S. suis inoculatie.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat veel ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van **5.1 lid2h** worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren van de dieren tot minder onrust leidt. Het inoculeren gebeurt door middel van een spuitje in de bek en spray in de neus. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt.
- Er wordt gebruik gemaakt van een mild pathogene stam van S. suis bacteriën waardoor ernstige ziekteverschijnselen voorkomen worden. Uit welzijnsevaluaties van eerdere proeven verwachten we geen toename in uitval en het aantal medisch behandelde dieren.

#### **E. Humane eindpunten**

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen na *S. suis* inoculatie. De milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn een verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte gewrichtsontsteking. Hoewel er een mild pathogene stam van *S. suis* gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan *S. suis* ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de *S. suis* inoculatie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten voor 4 dagen na *S. suis* inoculatie en worden de biggen driemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 4 dagen na inoculatie. [Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige symptomen specifiek voor \*S. suis\*, zoals ernstige kreupelheid, sepsis of hersenverschijnselen \(wanneer gewrichts- of eventueel hersenvliesontsteking onverwacht ernstig optreden\) zal de big bij de eerste verschijnselen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.](#)

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

0-3 %

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van *S. suis* inoculatie, van de bemonsteringen en van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (59% van de dieren). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (41% van de dieren). [Het ontbreken van eetbare hokverrijking is in de ongeriefsclassificatie meegenomen.](#)

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op <i>S. suis</i> kolonisatie is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door <i>S. suis</i> . Dit is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsprobleem bij gespeende biggen. De microbiom kolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de <i>S. suis</i> bacteriën). <a href="#">In <i>in vitro</i> onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen.</a> Ook kunnen <i>in vitro</i> studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met <i>S. suis</i> niet vervangen.
------------	--

Vermindering	De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op 5.1 lid2h en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in tonsil/neus/ rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de S. suis afweer test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen S. suis inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met S. suis geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden S. suis op de tonsillen hebben dan biggen die wel met S. suis geïnoculeerd worden. In de huidige proeven geeft zo'n blanco groep daarom geen additionele informatie meer en is de test zodanig opgezet dat met een negatieve en positieve controle volstaan kan worden. In de S. suis kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan in een observationele studie, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.
Verfijning	De S. suis kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van S. Suis bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De S. suis bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten en nasaal in de neus van de big gesprayed. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Op de dag van euthanasie worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om de onrust voor de dieren zo minimaal mogelijk te houden. Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in tonsil/neus/rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.



### **I. Herhaling**

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

### **J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

### **K. Bestemming van de dieren bij einde experiment**

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De gespeende biggen die geïnoculeerd zijn met S. suis worden gedood in het kader van de proef om de kolonisatie van S. suis na inoculatie in verschillende organen te bepalen.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
------------	-----------------

3

Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## Achtergrond

Na het spenen zijn biggen extra gevoelig voor infectieuze ziektes, omdat de verandering van voeding (van melk naar vast voer) en omgeving vaak leidt tot een onregelmatiger eetpatroon / onvoldoende voeropname. Dit kan leiden tot een (steriele) ontsteking van de darm en oxidatieve stress. Hierbij speelt ook een rol dat het maag-darmkanaal en het immuunsysteem van biggen nog niet volledig ontwikkeld is. Biggen zijn daarnaast gevoeliger omdat zij na het spenen niet meer beschermd worden door passieve immuniteit van de zeug. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op de immuun competentie van gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen de strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en in de praktijk ingezette vaccins.

De voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage zullen niet alleen toegepast worden in het voer voor gespeende biggen. Deze kunnen ook gegeven worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen, omdat uit de literatuur is gebleken dat deze de ontwikkeling van het immuunsysteem van biggen en de (latere) immuunrespons kunnen beïnvloeden.

In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op de immuun competentie van biggen. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden (zo kan bijvoorbeeld het gevoerde niveau aan antioxidanten op de minimumbehoefte-norm ingesteld worden). Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën toegepast worden in de praktijk om zo de immuun competentie, en daarmee het welzijn, van varkens te verbeteren (minder ziekte en sterfte), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica en zink te verminderen.

## Experimentele aanpak

De afgelopen jaren is uit onderzoek in de literatuur gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen (Bass et al., 2012; Luo et al., 2020) en zogende biggen (de Vries et al., 2020) de ontwikkeling van het immuunsysteem van biggen en de (latere) immuunrespons beïnvloed kan worden. De voerovergang bij spenen speelt bovendien een belangrijke rol in de darmmorfologie en -integriteit na het spenen, waardoor het belangrijk is onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom zijn in deze vervolgaanvraag ook zeugen en zogende biggen opgenomen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethodes

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)	
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gespeende biggen		Tweemaal LPS injectie (tussentijd 2 weken) gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van eerste LPS injectie
1	Ja				Ja	Dag 4
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-14
5			Ja	Ja	Ja	Dag 4-14

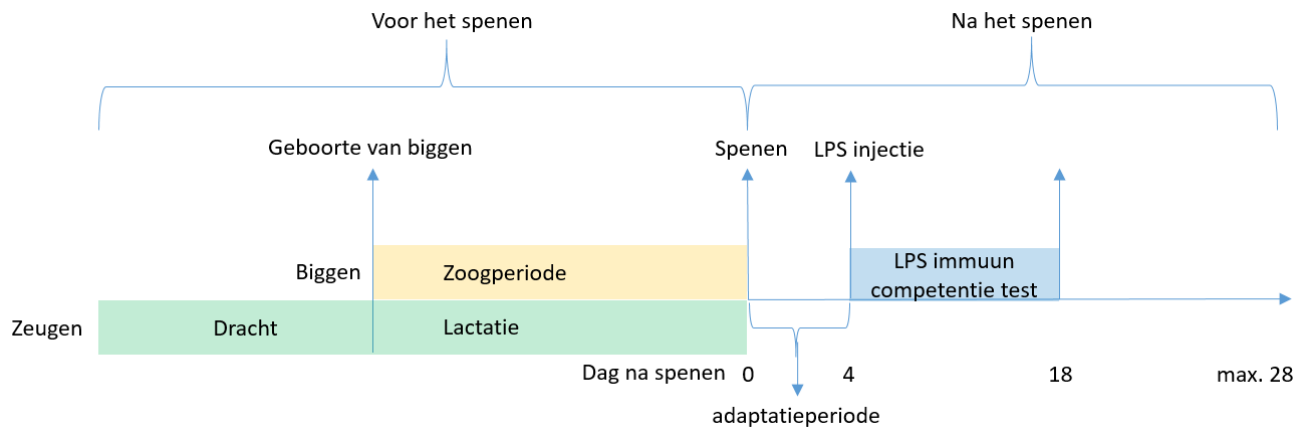
<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van de eerste injectie met LPS is afhankelijk van de lengte van de proefvoeraadaptatieperiode van het testproduct

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op de reactie van het immuunsysteem na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te injecteren met LPS na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab kan worden bekeken of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen. **Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.**

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnjecteerd worden met LPS op dag 4 en dag 18 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnjecteerd kunnen worden met LPS. Het moment van injecteren is dus flexibel, maar de eerste injectie is wel altijd tussen 4 en 14 dagen na het spenen.

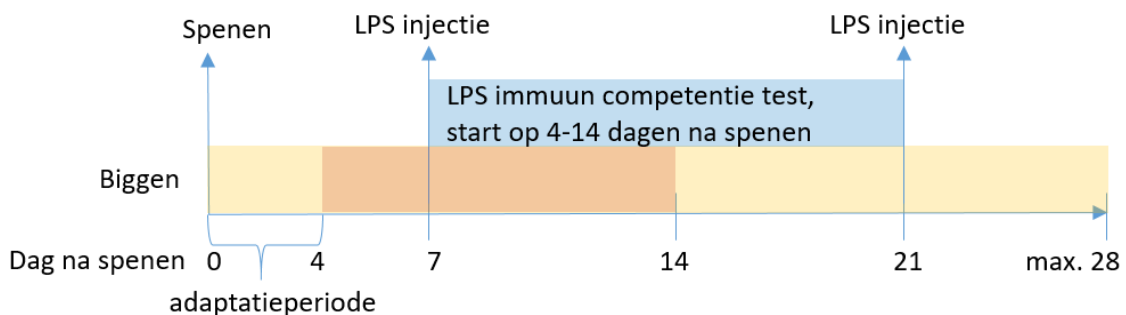
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnjecteerd met LPS.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen, worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen oefenen. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waarna de biggen voor het eerst geïnjecteerd worden met LPS.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet bij methoden waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de LPS immunocompetentie test kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

## Algemeen

### Adaptatie- en proefvoerderperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoerderadaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen oefenen. De lengte van de proefvoerderadaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waardoor de LPS immunocompetentie test zal starten op 4-14 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de LPS immunocompetentie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### LPS immuun competentie test (bestuderen van ontsteking en oxidatieve stress)

De LPS immuun competentie test omvat het intramusculair injecteren van gespeende biggen met zuiver LPS in een lage dosering, waarna op 1,5 en 3 uur na injectie een bloedmonster genomen zal worden om biomarkers voor ontsteking, namelijk cytokines en acutefase-eiwitten, en eventueel biomarkers voor oxidatieve stress te meten. Wanneer zuiver LPS wordt geïnjecteerd, dus zonder andere bacterie deeltjes, wordt een ontstekingsreactie opgeroepen, die snel weer verdwijnt. De effecten van een LPS injectie houden namelijk ongeveer 4 uur aan, waarna het dier herstelt. De ontstekingsreactie resulteert in een verhoging van de lichaamstemperatuur, welke gemonitord zal worden na injectie. Na twee weken krijgen de dieren nogmaals een gelijke dosis LPS intramusculair toegediend. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via *E. coli* bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de response te uniformeren en de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. **5.1 lid1c**

**5.1 lid2h, 5.1 lid2e** Ook na de tweede injectie met LPS wordt op 1,5 en 3 uur na injectie een bloedmonster genomen.

Als controle voor de LPS immuun competentie test kan een proefgroep geïnjecteerd worden met Phosphate Buffered Saline (PBS), een verdunningsmiddel dat neutraal is voor het dier. Hierdoor kan het effect van het handelen van het dier en de injectie worden vergeleken met de daadwerkelijke respons op LPS in relatie met de voerstrategie.

Omdat in de praktijk de biggen het meest gevoelig zijn in de eerste twee weken na spenen (van 4 tot 6 weken leeftijd, zie uitleg in projectvoorstel), start de LPS immuun competentie test binnen deze leeftijds categorie. Dit is van belang omdat er geen passieve immuniteit van de zeug meer is en het immuunsysteem en maagdarmkanaal met darmmicrobioom van de biggen op die leeftijd nog volop in ontwikkeling is, en leeftijd daarom een belangrijke rol speelt in de effecten die gevonden zullen worden. De dieren in de proef zijn dan wat betreft ontwikkelingsstadium zoveel mogelijk gelijk zijn aan de dieren onder praktijkomstandigheden.

### **Uitkomstparameters**

De primaire uitkomstparameters in de LPS immuun competentie test zijn:

1. Cytokines
2. Acutefase-eiwitten
3. Rectale temperatuur
4. Biomarkers voor oxidatieve stress
5. Lever enzymen

Aanvullend kan ook de activiteit van het dier gescoord worden. Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte en medische behandelingen). Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen om trent de immuunstatus, antioxidant status en het darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

### Referenties

- Bass, Benjamin Edward. 2012. Influence of Nutritional Modifications on Sow, Litter, and Nursery Performance. Theses and Dissertations.
- Luo, W., Xy, W., Zhang, J., Yao, J. and Xu, J. 2020. The Maternal Diet with Fish Oil Might Decrease the Oxidative Stress and Inflammatory Response in Sows, but Increase the Susceptibility to Inflammatory Stimulation in their offspring. *Animals* 10, 1455.
- De Vries, H., M. Geervliet, C.A. Jansen, V.P.M.G. Rutten, H. van Hees, N. Groothuis et al. 2020. Impact of Yeast-Derived  $\beta$ -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. *Microorganisms* 8, 1573

**5.1 lid2h**

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### LPS immuun competentie test

De LPS immuun competentie test start door een bekende, lage dosis van LPS intramusculair in het varken te injecteren. Twee weken later wordt een gelijke dosis opnieuw intramusculair geïnjecteerd.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 1 minuut
Frequentie:	2 injecties met een tussenperiode van 2 weken
Wijze:	Intramusculaire injectie

Onderbouwing: De dieren worden tweemaal geïnjecteerd om de individuele variatie te verkleinen. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. [5.1 lid1c](#)

5.1 lid2h, 5.1 lid2

### Bloedmonsters

In iedere proef worden bloedmonsters genomen bij gespeende biggen op 1,5 en 3 uur na de twee LPS (of PBS) injecties. Verder wordt er in iedere proef een afweging gemaakt of er aanvullende bloedmonsters nodig zijn bij de biggen en/of zeugen om de onderzoeksvraag te beantwoorden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 3 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 10 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie (rekening houdend met de korte duur tussen de bloedafname momenten na de injecties), hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

Onderbouwing: Bloedmonsters worden op 1,5 en 3 uur na de twee LPS (of PBS) injecties genomen om cytokines en acute-fase eiwitten te meten, dus in totaal 4 bloedmonsters. Daarnaast wordt in iedere proef een afweging gemaakt of ook op latere tijdstippen na injectie, bijvoorbeeld op 6, 12 of 24 uur na injectie bloed afgenomen zal worden, omdat sommige acute fase eiwitten later opkomen (Llamas Moya et al., 2006). Bloedmonsters kunnen ook o.a. gebruikt worden om de antioxidant status te bepalen. Daarnaast kunnen aanvullend bloedmonsters genomen worden bij biggen en/of zeugen om de effectiviteit van de voeradditieven en voer(productie)strategieën op het basale niveau (zonder immuun activatie) van de immuun parameters te bestuderen.

### Rectale temperatuur

In iedere proef wordt de rectale temperatuur van de gespeende biggen gemeten voorafgaand aan de LPS (of PBS) injecties, en maximaal 5 x na de injectie.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 12 x
Moment:	1 x voorafgaand aan injectie en maximaal 5 x binnen 24 uur na injectie

Onderbouwing: De rectale temperatuur wordt gemeten om de ontstekingsrespons in kaart te brengen.

### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen en eventuele aanvullende parameters zijn verse mestmonsters of rectale swabs nodig. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden. In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er mestmonsters verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 8 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en om vat het nemen van

een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Verse mestmonsters kunnen nodig zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, bijvoorbeeld voor het bepalen van de antioxidant status middels TAC (total antioxidant capacity) of voor het bepalen van biomarkers voor ontsteking zoals TPO (total peroxidase activity). Wanneer de analyse het toelaat zullen mestmonsters vanaf de vloer verzameld worden, waardoor rectale stimulatie niet nodig is. Wanneer het darmmicrobioom een rol speelt in het werkingsmechanisme, bijvoorbeeld bij probiotica, kan ook een rectale swab gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen. Dit wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters of rectale swabs bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of en wanneer er monsters na euthanasie verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef. Bij methode 1 t/m 4 kan het nodig zijn ook monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit kan noodzakelijk zijn om bijvoorbeeld de lokale immuunrespons in de darmwand (bijv. door middel van genexpressie), het microbioom in de darm, en darm morfologie en -integriteit te onderzoeken of de antioxidant status in organen.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speekselmonsters of tonsil swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen.

#### Speekselmonster

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen

Onderbouwing: Speekselmonsters kunnen nodig zijn om het werkingsmechanisme van de voerstrategie te bestuderen. In het speeksel kunnen biomarkers voor de gezondheidsstatus, bijvoorbeeld antilichamen zoals sIgA, en biomarkers voor oxidatieve stress bepaald worden.

#### Tonsil swab

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Tonsil swabs kunnen in enkele gevallen, bijvoorbeeld bij onderzoek naar probiotica, ingezet worden om de relatie tussen de darm microbiota en tonsil microbiota te onderzoeken. Onderzoek van het microbioom van de tonsillen is daarom incidenteel informatief in dit type onderzoek.

### Referenties

Llamas Moya, S., Boyle, L., Lynch, P., Arkins, S. 2006. Pro-inflammatory cytokine and acute phase protein responses to low-dose lipopolysaccharide (LPS) challenge in pigs. *Animal Science* 82: 527–534.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse worden gegevens uit eerdere proeven op 5.1 lid2h of uit de literatuur gebruikt. Uit onze eerdere onderzoeken is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in acute fase-eiwitten en cytokines. Het exacte aantal zeugen en biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.



## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	120	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	150	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	360	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van <a href="#">5.1 lid2h</a> .
Levensstadia	<p>In dit onderzoek worden zeugen (pariteit <math>\geq 1</math>) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op de immuun-competentie bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).</p> <p><u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari -december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.</p>
Aantal	<p><u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u> 2 proeven in 5 jaar, 2-8 behandelingen per proef, 10-15 zeugen per behandeling. Gemiddeld 2 proeven x 6 behandelingen x 10 zeugen = 120 zeugen.</p> <p><u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u> 1 proef per jaar, 3-10 behandelingen per proef, 6-17 biggen per behandeling. 1 proef x 6 behandelingen x 17 dieren = 202 biggen x 5 jaar = 510 biggen. Hiervan worden 360 biggen (zowel voor als) na spenen ingezet (1 proef per jaar x 6 behandelingen x 12 dieren = 72 biggen x 5 jaar = 360 biggen). De andere 150 biggen worden alleen tot spenen gevolgd om biggen te kunnen selecteren die voldoende vast voer hebben opgenomen in de kraamstal.</p>
Geslacht	<p>Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek.</p> <p>Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.</p>
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

## C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Het is niet altijd mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De zeugen en biggen worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingmaterialen.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. [In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.](#)

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van [5.1.1021](#). In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten).

#### Referenties

Kubasova T., Davidova-Gerzova L., Merlot E., et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.

Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluivers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

Luo, L., Jansen, C.A.; Bolhuis, J.E.; Arts, J.A.J.; Kemp, B.; Parmentier, H.K. 2020. Early and later life environmental enrichment affect specific antibody responses and blood leukocyte subpopulations in pigs. *Physiology & behavior*: 112799.

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De biggen kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens het injecteren van LPS (of PBS) en tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, toedienen van injecties, bloedafname, rectale temperatuur). Ook fixatie (voor bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens.
- Verwacht wordt dat de dieren kortdurende milde tot matige ziekteverschijnselen zullen ontwikkelen na de LPS injecties, zoals een verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur op de dag van de LPS injectie (0.9-1.3°C verhoging t.o.v. negatieve controle met PBS injectie). Verwacht wordt dat deze klinische verschijnselen tot 4 uur na de LPS injectie aanhouden, waarna het dier herstelt en de voeropname weer op gang komt. We verwachten op basis van voorgaande proeven geen toename in medische behandelingen of uitval.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen).
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de LPS injecties.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat geruime ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren van de dieren tot minder onrust leidt.
- Alvorens de 1<sup>e</sup> LPS injectie toegediend zal worden aan gespeende biggen, vindt er eerst een adaptatieperiode plaats. Het spenen van biggen kan namelijk stressvol ervaren worden door de gelijktijdige veranderingen die optreden in voer en (sociale) omgeving. Door een adaptatieperiode in te lassen, vindt het toedienen van LPS plaats op een moment welke minder stressvol is voor de biggen. Hierdoor wordt het risico op ongerief beperkt. Bovendien is dit ook noodzakelijk voor de proefopzet, omdat als de LPS immuun competentie test direct na spenen uitgevoerd zal worden, de resultaten meer variatie kunnen vertonen wegens individuele verschillen voor wat betreft stress geassocieerd met spenen tussen de dieren.
- We gebruiken een lage LPS dosering. Op basis van eerdere proeven verwachten we geen ernstige ziekteverschijnselen en geen toename in uitval en het aantal medisch behandelde dieren.

## E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In principe wordt er geen humaan eindpunt verwacht.

We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen vanaf ongeveer 30 minuten na LPS injectie tot 4 uur na LPS injectie. De kortdurende milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur. Hoewel er een lage dosering van LPS gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de LPS injectie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen gemeten op de dag van en de dag na de LPS injectie en worden de biggen driemaal binnen 24u na de LPS injectie gecontroleerd op klinische verschijnselen. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.

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

0-1 %

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van de LPS injecties (gevolgd door immuun activatie), van de bemonsteringen en in sommige proeven van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (57% van de dieren). Het ongerief is licht voor de biggen met de PBS injecties (dieren in de controle behandeling). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (43% van de dieren). [Het ontbreken van eetbare hokverrijking is in de ongeriefsclassificatie meegenomen.](#)

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te doen over het effect van voer(productie)strategieën en voeradditieven bij zeugen en hun biggen op de immuun competentie van gespeende biggen is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door ziekteverwekkers. Het afweersysteem van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben, welke een belangrijke rol spelen in de immuun competentie. <a href="#">In <i>in vitro</i> onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen.</a> Ook kunnen <i>in vitro</i> studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere afweerreactie van biggen niet vervangen.
Vermindering	De onderzoeksofzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <a href="#">5.1 lid2h</a> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.
Verfijning	De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via <i>E. coli</i> bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

## I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Euthanasie zal naar schatting plaatsvinden in 60% van de ingezette biggen na het spenen, en daarom naar schatting worden uitgevoerd in maximaal 216 biggen over 5 jaar (60% van 360). Het euthanaseren zal, bij onderzoeksvragen naar het werkingsmechanisme van de strategieën, bijdragen aan de interpretatie van de resultaten. Op basis van de beschikbare informatie over de strategieën zal worden bepaald of een subset van de varkens geëuthanaseerd zal worden in het kader van de proef, bijvoorbeeld om de concentratie van antioxidanten in lever en spieren te beoordelen, of de lokale immuunrespons in de darmwand en darmmorfologie en -integriteit te onderzoeken.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.



# Advies aan CCD

## B

Datum 20 mei 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114588

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.  
 Aanvraagnummer: AVD202114588  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

<b>Proces</b>	<p>Vragen aan aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?</li> <li>- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee significant minder leefruimte zullen hebben dan de voorgeschreven 5 vierkante meter die in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU wordt voorgeschreven voor dieren van meer dan 150 kg.</li> <li>- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is in de bijlagen onvoldoende navolgbaar. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten.</li> <li>- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de humane eindpunten concreter te formuleren, zodat op voorhand duidelijk is wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.</li> </ul> <p>Vragen NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wij verzoeken u om het feit dat een deel van de dieren gedood zal worden ook te vermelden onder 'Wat zijn de verwachte</li> </ul>
---------------	---





gevolgen/nadelige effecten voor de dieren'.

- Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.



# Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD\_5.1 lid2e en 5.1 lid2e - 5.1 lid2e.pdf

---

Pagina: 2

---

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 15:42:12

---

Ik zou ze waarschijnlijk vragen om ook nog onder expected harms toe te voegen dat de biggen op transport gaan (bijlage 2), de zeugen vaginale swabs krijgen en sommige biggen antibiotica.

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 2-7-2021 20:05:33

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 15:24:54

---

rare afbreking

Status


5.1 lid2e Geaccepteerd 2-7-2021 20:05:24

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen (alleen zogend)	540	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen (gespeend of zowel zoogperiode als gespeend)	900	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen (alleen zogend)	420	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen (gespeend of zowel zoogperiode als gespeend)	600	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen (alleen zogend)	270	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen (gespeend of zowel zoogperiode als gespeend)	360	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn





## Pagina: 3

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 10:43:55  
waarom heb je de aantallen uitgesplitst? Doen we nooit, maar als je een goede reden hebt wil ik hem graag horen

Status

 5.1 lid2e Geaccepteerd    2-7-2021 20:05:14  
 Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 2-7-2021 20:05:15  
aangepast

---

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid 2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.

## Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

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

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

#### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

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

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


#### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

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

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

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

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b> 	<p>Citaat C9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) x Hergebruik (1e, lid 2) De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.</p> <p>Citaat C10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.</p> <p>Citaat A9. j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht</p>
--	---

## Pagina: 5

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 15:42:42  
Ik zou heel even kijken of de aanhoud termijnen goed in MAUS staan, 5.2 lid1

Status  
5.1 lid2e Geaccepteerd      2-7-2021 20:05:42



gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.) Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op de immunocompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli of S. suis bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.

Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende

samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:

De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.

Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande preventie strategieën (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).

3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren. 

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.


Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.

# Pagina: 7

---

 Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 15:49:56  
beetje ingewikkeld geformuleerd wel


Status  
5.1 lid2e Geaccepteerd      2-7-2021 20:05:54

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	5.2 lid 1
<h1>5.2 lid 1</h1>	
<p>Wij erkennen het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het blijkt echter problematisch om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per project verschillend is. Het standpunt van de CCD aangaande deze afwijkingen is nee-tenzij. Hierbij is van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is.</p>	



## Pagina: 8

 Nummer: 1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 21-5-2021 14:32:06
 Nummer: 2 weg	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 21-5-2021 14:32:04
 Nummer: 3 weg	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 21-5-2021 14:32:22
 Nummer: 4 weg	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 21-5-2021 14:32:32
 Nummer: 5 5.2 lid1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Notitie	Datum: 21-5-2021 14:39:37

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat.</p> <p>De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen.</p> <p>Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en E. coli en S. suis infecties te verminderen.</p> <p><b>Uiteindelijke doel:</b> Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale voer- en additieven producenten. Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.</p> <p><b>Hieronder vallen drie subdoelen:</b> het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen</li><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen</li><li>• de immuun competentie van gespeende biggen</li></ul>
-------------------------------------	--

<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat. Wetenschappelijk belang Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbioom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.</p> <p>Maatschappelijk belang E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibioticagebruik, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt.</p>
<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7. Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij 5.1 lid2h acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>



**3V's**

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of in vitro onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In in vitro onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen in vitro studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> zie 3.4.3.1.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <a href="#">5.1 lid2h</a> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <a href="#">5.1 lid2h</a> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1. Additioneel:</p> <p>Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen.</p>


	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via E. coli bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken.</p> <p>Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
--	---

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen: Citaat.	Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen: Zie 3.4.3.1.	
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen: zie 3.4.3.1.	

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-2%	<p>We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde klinische verschijnselen na E. coli inoculatie. De milde klinische verschijnselen die we verwachten zijn diarree, een verminderde voeropname en verminderde activiteit (maar wel alert). Hoewel er een mild pathogene stam van E. coli gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan E. coli ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht.</p> <p>Om de gezondheid van de biggen na de E. coli inoculatie daarom goed te controleren wordt de individuele mestconsistentie eenmaal daags bepaald, wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten en worden de biggen minimaal driemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 5 dagen na inoculatie. Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor, niet drinken en niet alert zijn, zal de big meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.</p>
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	

Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op <i>S. suis</i> kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-3%	We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen na <i>S. suis</i> inoculatie. De milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn een verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte gewrichtsontsteking. Hoewel er een mild pathogene stam van <i>S. suis</i> gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan <i>S. suis</i> ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de <i>S. suis</i> inoculatie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten voor 4 dagen na <i>S. suis</i> inoculatie en worden de biggen driemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 4 dagen na inoculatie. Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige symptomen specifiek voor <i>S. suis</i> , zoals ernstige kreupelheid, sepsis of hersenverschijnselen (wanneer gewrichts- of eventueel hersenvliesontsteking onverwacht ernstig optreden) zal de big bij de eerste verschijnselen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	

<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>	HEP: 0-1%	Citaat. In principe wordt er geen humaan eindpunt verwacht. We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen vanaf ongeveer 30 minuten na LPS injectie tot 4 uur na LPS injectie. De kortdurende milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur. Hoewel er een lage dosering van LPS gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de LPS injectie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen gemeten op de dag van en de dag na de LPS injectie en worden de biggen driemaal binnen 24u na de LPS injectie gecontroleerd op klinische verschijnselen. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.
 1 Varkens (Sus scrofa domestica)	Ongerief: 100,0% Licht	
Varkens (Sus scrofa domestica)	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid 1

Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit, maar is niet geheel navolgbaar. De DEC heeft initieel twijfels gehad over verschillende aspecten van de aanvraag en veel vragen gesteld aan de aanvrager. Bij veel C-vragen ontbreekt echter een onderbouwing voor de uiteindelijke conclusie van de DEC. In haar ethische afweging geeft de DEC in haar ethische afweging aan te twijfelen aan de omvang van de bijdrage van het project aan de gezondheid van pasgeboren biggen. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een





meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek. Het DEC advies geeft echter geen inzicht in de discussie die op dit punt gevoerd is.

De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD **5.1 lid2h**. In het projectvoorstel wordt niet vermeld wat de opbrengsten van de voorgaande proeven zijn geweest. De aanvrager is gevraagd naar de opbrengsten van de voorgaande projectvergunning.



Huisvesting voldoet niet aan bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De DEC adresseert een algemeen dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktiiknormen. Het

**5.2 lid1**

**5.2 lid1**



Er zal sprake zijn van hergebruik, de gebruikte zeugen doorlopen meerdere cycli. In bijlage 1 staat niet beschreven of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. De aanvrager is verzocht dit punt toe te lichten.



De humane eindpunten zijn **5.2 lid1**

**5.2 lid1** De aanvrager is verzocht om meer concrete HEPs te formuleren.

Berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is niet navolgbaar op basis van de bijlagen, omdat er geen uitwerking wordt gegeven van de powerberekeningen en de KSV methode. De aanvrager is verzocht om meer informatie te verschaffen in de berekening van de groepsgroottes.

De NTS bevat nog onvoldoende informatie op het gebied van verfijning en de nadelige gevolgen voor de dieren. De aanvrager is verzocht op deze punten meer informatie te verschaffen (zie gestelde vragen).

Het project richt zich op voeding voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom de veehouderij geldt ook voor dit project. Hoewel in de intensieve veehouderij de gezondheid van de dieren onder druk staat, richt dit project zich juist op het ontwikkelen van dieet en voederstrategieën om de weerbaarheid van varkens tegen bepaalde infecties te bevorderen.

Voor de dieren is  sprake van licht tot matig ongerief. Dit wordt o.a. veroorzaakt 

## Pagina: 18

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 14:50:10

Ik zie dit niet onder proces staan, 5.2 lid1

---

Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 15:52:03

ik heb dit eerder ergens gezien en ook nagevraagd, was volgens mij ook een veiligheidsdingetje (ook voor onderzoeker, niet alleen voor de biggen)

---

Nummer: 3      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 21-5-2021 14:48:53

rare afbreking

door de huisvesting, inoculatie met een ziekteverwekker, het nemen van monsters en het doden van (een deel van) de dieren. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten naast potentiële gezondheidsaspecten (en daarmee ook productie) mogelijk ook duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu en wetenschappelijke inzichten (publicaties). Het

 **5.2 lid 1**

#### **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

**5.2 lid 1**

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

**B**

Datum 20 mei 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114588

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.  
Aanvraagnummer: AVD202114588  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

<b>Proces</b>	<p>Vragen aan aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?</li><li>- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee significant minder leefruimte zullen hebben dan de voorgeschreven 5 vierkante meter die in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU wordt voorgeschreven voor dieren van meer dan 150 kg.</li><li>- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is in de bijlagen onvoldoende navolgbaar. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten.</li><li>- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de humane eindpunten concreter te formuleren, zodat op voorhand duidelijk is wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.</li></ul> <p>Vragen NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Wij verzoeken u om het feit dat een deel van de dieren gedood zal worden ook te vermelden onder 'Wat zijn de verwachte</li></ul>
---------------	--

gevolgen/nadelige effecten voor de dieren'.

- Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen (alleen zogend)	540	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen (gespeend of zowel zoogperiode als gespeend)	900	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen (alleen zogend)	420	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen (gespeend of zowel zoogperiode als gespeend)	600	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen (alleen zogend)	270	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen (gespeend of zowel zoogperiode als gespeend)	360	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.

## Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.



## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

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

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

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

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

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

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

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

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

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.</li><li>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</li></ul>
--	---

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat C9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) x Hergebruik (1e, lid 2) De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.</p> <p>Citaat C10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.</p> <p>Citaat A9. j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht</p>
-------------------	---

gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.) Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op de immunocompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli of S. suis bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.

Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende

samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:

De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.

Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande preventie strategieën (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).

3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. 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.</p>
<p>U hebt in uw advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Het is echter moeilijk navolgbaar hoe deze antwoorden tot uw conclusies hebben geleid bij de beoordelingsvragen, omdat een heldere onderbouwing bij de beantwoording van de C vragen vaak ontbreekt. Wij waren graag meer meegenomen, omdat u initieel twijfels gehad bij verschillende aspecten van de aanvraag en er veel vragen zijn gesteld aan de aanvrager.</p> <p>In uw ethische afweging is vrij beknopt en hierdoor moeilijk navolgbaar. U kent het wetenschappelijk belang van het project een beperkte morele waarde toe en geeft u aan te twijfelen aan de omvang van de bijdrage van het project aan de gezondheid van pasgeboren biggen. Daartegenover stelt u een substantieel belang van de proefdieren met een hoge morele waarde. In het licht van deze overwegingen is voor ons niet goed navolgbaar hoe de ethische afweging uiteindelijk in het nadeel van de proefdieren is gevallen. Daarnaast hadden wij graag in het advies teruggelezen waar uw twijfels aangaande de gezondheidseffecten van het project op gebaseerd zijn en op welke wijze de aanvrager uw zorgen op dit vlak heeft weten weg te nemen.</p> <p>Tot slot blijkt dat één DEC-lid zich onthouden heeft van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek. In het licht van het bovenstaande punt aangaande de ethische afweging hadden wij de discussie die omtrent dit onderwerp is gevoerd graag teruggezien in het advies.</p> <p>Wij erkennen het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het blijkt echter problematisch om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per project verschillend is. Het standpunt van de CCD aangaande deze afwijkingen is nee-tenzij. Hierbij is van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is.</p>	

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat.</p> <p>De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen.</p> <p>Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en E. coli en S. suis infecties te verminderen.</p> <p>Uiteindelijke doel: Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale <b>5.1 lid2h</b>. Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.</p> <p>Hieronder vallen drie subdoelen: het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen</li><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen</li><li>• de immuun competentie van gespeende biggen</li></ul>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat. Wetenschappelijk belang Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbioom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.</p> <p>Maatschappelijk belang E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7. Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij 5.1 lid2h acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

### 3V's

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of in vitro onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In in vitro onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen in vitro studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> zie 3.4.3.1.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.</p>
Verfijnen	



	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1. Additioneel:</p> <p>Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen.</p>

	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via E. coli bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken.</p> <p>Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
--	---

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen: Citaat.	Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen: Zie 3.4.3.1.	
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen: zie 3.4.3.1.	

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-2%	<p>We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde klinische verschijnselen na E. coli inoculatie. De milde klinische verschijnselen die we verwachten zijn diarree, een verminderde voeropname en verminderde activiteit (maar wel alert). Hoewel er een mild pathogene stam van E. coli gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan E. coli ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht.</p> <p>Om de gezondheid van de biggen na de E. coli inoculatie daarom goed te controleren wordt de individuele mestconsistentie eenmaal daags bepaald, wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten en worden de biggen minimaal driemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 5 dagen na inoculatie. Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor, niet drinken en niet alert zijn, zal de big meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	

Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op <i>S. suis</i> kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-3%	We verwachten slechts bij hoge uitzondering een humaan eindpunt te bereiken. We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen na <i>S. suis</i> inoculatie. De milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn een verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte gewrichtsontsteking. Hoewel er een mild pathogene stam van <i>S. suis</i> gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan <i>S. suis</i> ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de <i>S. suis</i> inoculatie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten voor 4 dagen na <i>S. suis</i> inoculatie en worden de biggen driemaal daags gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 4 dagen na inoculatie. Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. Bij ernstige symptomen specifiek voor <i>S. suis</i> , zoals ernstige kreupelheid, sepsis of hersenverschijnselen (wanneer gewrichts- of eventueel hersenvliesontsteking onverwacht ernstig optreden) zal de big bij de eerste verschijnselen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd.
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	

<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>	HEP: 0-1%	Citaat. In principe wordt er geen humaan eindpunt verwacht. We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen vanaf ongeveer 30 minuten na LPS injectie tot 4 uur na LPS injectie. De kortdurende milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur. Hoewel er een lage dosering van LPS gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de LPS injectie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen gemeten op de dag van en de dag na de LPS injectie en worden de biggen driemaal binnen 24u na de LPS injectie gecontroleerd op klinische verschijnselen. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit, maar is niet geheel navolgbaar. De DEC heeft initieel twijfels gehad over verschillende aspecten van de aanvraag en veel vragen gesteld aan de aanvrager. Bij veel C-vragen ontbreekt echter een onderbouwing voor de uiteindelijke conclusie van de DEC. In haar ethische afweging geeft de DEC in haar ethische afweging aan te twijfelen aan de omvang van de bijdrage van het project aan de gezondheid van pasgeboren biggen. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een

meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek. Het DEC advies geeft echter geen inzicht in de discussie die op dit punt gevoerd is.

De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD **5.1 lid2h** . In het projectvoorstel wordt niet vermeld wat de opbrengsten van de voorgaande proeven zijn geweest. De aanvrager is gevraagd naar de opbrengsten van de voorgaande projectvergunning.

Huisvesting voldoet niet aan bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De DEC adresseert een algemeen dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het Secretariaat ziet hier in de huidige aanvraag echter geen directe aanleiding voor. **5.2 lid1**

Er zal sprake zijn van hergebruik, de gebruikte zeugen doorlopen meerdere cycli. In bijlage 1 staat niet beschreven of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. De aanvrager is verzocht dit punt toe te lichten.

De humane eindpunten zijn in de ogen van **5.2 lid1** . De aanvrager is verzocht om meer concrete HEPs te formuleren.

Berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is niet navolgbaar op basis van de bijlagen, omdat er geen uitwerking wordt gegeven van de powerberekeningen en de KSV methode. De aanvrager is verzocht om meer informatie te verschaffen in de berekening van de groepsgroottes.

De NTS bevat nog onvoldoende informatie op het gebied van verfijning en de nadelige gevolgen voor de dieren. De aanvrager is verzocht op deze punten meer informatie te verschaffen (zie gestelde vragen).

Het project richt zich op voeding voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom de veehouderij geldt ook voor dit project. Hoewel in de intensieve veehouderij de gezondheid van de dieren onder druk staat, richt dit project zich juist op het ontwikkelen van dieet en voederstrategieën om de weerbaarheid van varkens tegen bepaalde infecties te bevorderen. Voor de dieren is er sprake van licht tot matig ongerief. Dit wordt o.a. veroorzaakt

door de huisvesting, inoculatie met een ziekteverwekker, het nemen van monsters en het doden van (een deel van) de dieren. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten naast potentiële gezondheidsaspecten (en daarmee ook productie) mogelijk ook duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu en wetenschappelijke inzichten (publicaties). <sup>5.2 lid1</sup>

## **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**

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** vrijdag 21 mei 2021 15:59  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** RE: 2e controle AVD 5.1 lid2h 202114588

Ha 5.1 lid2e

Deze is ook gedaan. 5.2 lid1

5.2 lid1

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen  
Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0800 7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** vrijdag 21 mei 2021 14:26  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** FW: 2e controle AVD 5.1 lid2h 202114588

Hoi 5.2 lid1

5.2 lid1

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** donderdag 20 mei 2021 16:57  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** 2e controle AVD 5.1 lid2h 202114588

Hoi 5.1 lid2e

Kun jij de 2<sup>e</sup> controle doen van AVD 5.1 lid2h 202114588?

5.2 lid1

5.1 lid2h



Groet!

5.1 Id2e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 3 juni 2021 15:53  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**CC:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114588

Geachte 5.1 lid2e

Op 25-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114588. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### Welke informatie nog nodig

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

#### Niet technische samenvatting

- Wij verzoeken u om de NTS aan te vullen onder 'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren', zodat deze een volledig beeld geeft van de inhoud van het project. Dus hier graag ook vermelden dat sommige biggen antibiotica zullen krijgen toegediend en/of op transport gaan, zeugen vaginale swabs krijgen en een deel van de dieren gedood zal worden. - Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.

#### Onduidelijkheden

- Deze aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h . In het projectvoorstel wordt echter niet vermeld wat de opbrengsten van de proeven onder de voorgaande vergunning zijn geweest. Dit is echter relevante informatie voor het beoordelen van uw huidige projectaanvraag. Wij verzoeken u daarom om deze opbrengsten toe te voegen aan het projectvoorstel.
- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?
- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee minder leefruimte zullen hebben dan de minimaal voorgeschreven oppervlakte in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.
- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is onvoldoende navolgbaar in de bijlagen. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten zodat uit de bijlagen blijkt hoe het aantal dieren tot stand komt.
- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de humane eindpunten in iedere bijlage concreter te formuleren, zodat duidelijk blijkt wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op deze vragen te reageren. Als u uiterlijk 17 juni 2021 op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 18 juni 2021 worden ingebracht bij de bespreking van uw aanvraag

**Wanneer een beslissing**

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

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

**5.1 lid2e**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 3 juni 2021 12:36  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Geachte DEC 5.1 lid2h

Op 25-02-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114588.

Tijdens de behandeling van deze aanvraag stuitte wij op enkele onduidelijkheden waar wij graag aanvullend advies over zouden ontvangen.

Uw conclusie onder C9. is niet geheel navolgbaar. U geeft aan dat de afwijking van de Wod voldoende onderbouwd acht, maar geeft geen toelichting bij deze conclusie. Kunt u verder toelichten waarop u uw conclusie gebaseerd heeft?

Kunt u een toelichting geven bij uw conclusie onder C10. Met name met betrekking tot het huisvesten van zeugen in kraamhokken die niet voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. Op basis van de stukken is namelijk niet te achterhalen op basis van welke argumenten de aanvrager voor deze vorm van huisvesting heeft gekozen. Ook blijkt uit het antwoord onder J. onder A9 dat binnen afzienbare tijd een diervriendelijker alternatief beschikbaar zal komen.

In uw schade baten analyse geeft u aan te twijfelen aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten van het project. U geeft echter geen toelichting over de oorsprong van deze twijfels.

De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h . De opbrengsten van dit project zouden daarom indicatief moeten zijn voor de huidige aanvraag. bent u bekend met de opbrengsten van AVD 5.1 lid2h en kunt u toelichten waarom u twijfelt aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten?

Het bovenstaande punt aangaande de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten raakt ook aan de de mogelijke gevolgen voor de haalbaarheid van (een deel van) de doelstellingen. Daarmee lijkt uw twijfel onder punt 2 van de ethische afweging strijdig met uw conclusie onder C8. Kunt u toelichten hoe de antwoorden van de aanvrager uw initiële twijfels, zoals beschreven onder C8, hebben weggenomen en of u verwacht dat de doelstelling omtrent de beoogde gezondheids-/welzijnseffecten realistisch en haalbaar zijn?

De schade baten analyse onder D is niet geheel navolgbaar. Op basis van punt 2 onder D. Ethische Afweging lijkt uw schade baten analyse negatief uit te vallen. U kent immers een substantieel belang met hoge morele waarde toe aan de proefdieren, tegenover een reëel belang van beperkte morele waarde voor de onderzoekers. Daarbij geeft u aan te twijfels te hebben bij de gezondheids-/welzijnsopbrengsten voor de doeldieren. Kunt u toelichten hoe u uiteindelijk tot een positieve beantwoording van de centrale morele vraag heeft geleid?

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het is, in het kader van transparantie, belangrijk om naast de weergave van argumenten voor het meerderheidsstandpunt ook de argumenten voor het minderheidsstandpunt weer te geven in het advies. Wij willen u daarom vragen om het minderheidsstandpunt te specificeren op niveau van verschillende belanghebbenden van het project en de waarden die in het geding zijn voor elk van de belanghebbenden.

Het project richt zich op voer(productie)strategieën en/of additieven de voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom dierproeven ten behoeve van de veehouderij geldt daarmee ook voor dit project. Kunt u toelichten hoe u tegen dit dilemma aankijkt?

Indien mogelijk zouden wij de aanvullende informatie graag voor vrijdag 11 juni ontvangen, zodat wij ons advies kunnen finaliseren voor de CCD vergadering van vrijdag 18 juni 2021. Wij horen graag of dit mogelijk is.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Betreft: AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202114588, 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen'**

### **Beantwoording vragen van de CCD, gesteld in de brief van 03-06 2021**

Geachte leden van de CCD,

Op 03-06-2021 hebben wij uw email ontvangen betreffende het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen' met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202114588. Bij deze ontvangt u antwoorden op de door u gestelde vragen m.b.t. dit project.

Aanpassingen in het projectvoorstel en de bijlagen zijn zichtbaar gemaakt met een **groene** tekstkleur.

#### **Niet technische samenvatting**

- **Wij verzoeken u om de NTS aan te vullen onder 'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren', zodat deze een volledig beeld geeft van de inhoud van het project. Dus hier graag ook vermelden dat sommige biggen antibiotica zullen krijgen toegediend en/of op transport gaan, zeugen vaginale swabs krijgen en een deel van de dieren gedood zal worden.**
- **Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.**

Wij hebben de ontbrekende informatie toegevoegd aan de NTS. De informatie is tevens hieronder weergegeven:

'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren'

Na toediening van de (milde) ziekteverwekker of activatie van het afweersysteem kunnen de gespeende varkens zich in algemene zin ziek voelen gedurende een beperkte periode (uren tot een paar dagen). Ze zijn dan minder actief (wel alert) en eten minder en ze kunnen koorts of diarree krijgen. Het nemen van swabs (rectaal, van de keelamandelen of neus en bij de zeugen soms ook uit de vagina) en mestmonsters zal hooguit lichte stress opleveren bij de zeugen en biggen. Het afnemen van bloedmonsters kan kortdurend lichte pijn en stress opleveren. In proeven waarin de bacteriegroei van E. coli wordt gevolgd, zal een deel van de biggen antibiotica krijgen via het drinkwater om reeds aanwezige E. coli bacteriën voorafgaand aan de besmetting te verminderen. In proeven waarin de bacteriegroei van Streptokokken wordt gevolgd, zullen biggen verplaatst worden naar een andere stal op hetzelfde bedrijfsterrein en gehergroepeerd worden om een gestandaardiseerd moment van lichte stress te veroorzaken en zo een Streptokokken infectie op een voorspelbare manier te laten aanslaan. Een deel van de ingezette biggen wordt na de proef gedood om bijvoorbeeld effecten op bacteriegroei in darminhoud te kunnen onderzoeken.

'Verfijning'

Er wordt een milde vorm van de ziekteverwekker gebruikt, die zorgvuldig geselecteerd en getest is in de afgelopen jaren, of een lage dosering van het stofje dat het immuunsysteem activeert. Hierbij kan de vermeerdering van de ziekteverwekker of de activatie van het afweersysteem gevolgd worden met behulp van bemonsteringen en waarnemingen, maar met zo min mogelijk ziekteverschijnselen. Na blootstelling aan de (milde) ziekteverwekker of activatie van het immuunsysteem worden de gespeende biggen nauwlettend gecontroleerd op ziekteverschijnselen en lichaamstemperatuur. In het uitzonderlijke geval dat dieren een reactie geven die langduriger of ernstiger is dan verwacht worden zij uit de proef gehaald. Indien de dieren aan het einde van de proef gedood worden, zullen bloedmonsters op die dag na de dood genomen worden.

## Onduidelijkheden

- Deze aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD5.1 lid2h. In het projectvoorstel wordt echter niet vermeld wat de opbrengsten van de proeven onder de voorgaande vergunning zijn geweest. Dit is echter relevante informatie voor het beoordelen van uw huidige projectaanvraag. Wij verzoeken u daarom om deze opbrengsten toe te voegen aan het projectvoorstel.

De opbrengsten van projectvergunning AVD5.1 lid2h hebben wij hieronder toegelicht. Een samenvatting hiervan is aan het projectvoorstel toegevoegd onder '3.2.2'.

De opbrengsten vanuit het project in de afgelopen jaren kunnen verdeeld worden in:

- Verdieping van de reeds aanwezige kennis m.b.t. de ziekteverwekkers en kolonisatie modellen, de wijze waarop dieren reageren op infectie met een bacterie of op een activatie van het immuunsysteem.  
In de eerste periode nadat het vorige project vergund was, heeft door-ontwikkeling van de modellen voor E. coli en S. suis plaatsgevonden. Hierdoor zijn modellen kwalitatief verbeterd en is het steeds preciezer voorspelbaar geworden hoe de dieren reageren op de besmetting.
- kennis m.b.t. gevoerde nutriënten die van invloed kunnen zijn op de impact van een pathogene bacterie of immuun activatie bij biggen
- kennis m.b.t de invloed van het moederdier (zeug) en de wijze waarop zij gevoerd wordt op infecties en immuunreacties bij de nakomelingen (biggen)

De opbrengsten worden hieronder puntsgewijs verder toegelicht.

## Kennis m.b.t. de ziekteverwekkers en kolonisatiemodellen

5.1 lid2h werkt samen met 7 partners in 5.1 lid2h om S. suis infecties bij biggen te verminderen. Daarnaast wordt samengewerkt met 13 partners uit 9 Europese landen in een EU-project om alternatieven te vinden voor het gebruik van antimicrobiële middelen, die specifiek ingezet worden bij spendiarree door E. coli. Door samen te werken en samen gebruik te maken van opgedane kennis, zijn binnen 5.1 lid2h de infectiemodellen stapsgewijs verbeterd tot de huidige modellen voor S. suis en E. coli. De korte lijnen met partners zorgen voor een snelle implementatie van nieuwe inzichten.

- In samenwerking met de partners hebben wij de inoculatiemethode van S. suis geoptimaliseerd, omdat wij geleerd hebben dat S. suis voornamelijk hecht aan de tonsillen en neusholtes. In het huidige model worden de S. suis bacteriën zowel oraal (met een spuitje in de bek) als nasaal (d.m.v. een spray) geïnoculeerd, omdat tijdens onderzoek binnen de voorgaande projectvergunning is gebleken dat inoculatie via enkel de orale route (d.m.v. een capsule) onvoldoende is om de gewenste besmettingsgraad te bereiken.
- De wijze waarop varkens (onder praktijkomstandigheden) besmet worden met S. suis is ingewikkeld. Om S. suis bacteriën goed te laten aanslaan in het model en om deze wijze voorspelbaar en stabiel te maken, is het noodzakelijk gebleken om de biggen bloot te stellen aan een gestandaardiseerd stress moment voor de inoculatie. Dit wordt gedaan aangezien S. suis een korte levensduur heeft en makkelijker kan koloniseren bij een verminderde afweer door stress. Dit verhoogt de haalbaarheid van de proef. Hiervoor zijn verschillende stressoren voorafgaand aan inoculatie getest. Hierbij kwam het verplaatsen (naar een andere stal binnen 5.1 lid2h) en hergroeperen van de dieren als stressor het beste naar voren. Het verplaatsen en hergroeperen is daarbij onderdeel van het model geworden om de (her)haalbaarheid te vergroten. Zonder inzet van deze stressor heeft S. suis minder kans zich te koloniseren, en zijn er meer dieren nodig in de proef om het effect van de voerstrategieën te bestuderen. Andere methoden, zoals bewerking van het neusslijmvlies voorafgaand aan S. suis inoculatie, zijn bij

partner-5.1 lid2h in diezelfde periode getest, maar leverden minder voorspelbare resultaten op m.b.t. S. suis kolonisatie en het ongerief.

- Binnen het E. coli model wordt gebruik gemaakt van een protocol om de mestconsistentie van biggen te beoordelen. Dit protocol is verbeterd door het droge stof gehalte van mestmonsters te bepalen. Hiermee is het mest consistentie protocol (classificatie diarree ja of nee en de mate hiervan) objectiever geworden en kan effectiever informatie uitgewisseld worden tussen collega-5.1 lid2h
- Om het werkingsmechanisme van voerstrategieën zo goed mogelijk te kunnen begrijpen werken wij in de modellen met biomarkers in o.a. mest- en bloedmonsters, voor bijvoorbeeld (darm)ontsteking of oxidatieve stress. Uit onderzoek onder de voorafgaande projectvergunning is gebleken dat sommige (nieuwe) biomarkers (bijv. calprotectine of myeloperoxidase bepaling in de mest) meer of minder geschikt zijn in het doeldier, het varken. Ook hebben wij het panel van cytokines geoptimaliseerd om de immuunrespons na immuun activatie zorgvuldig te volgen. Door samenwerking met externe labs en innovatie binnen 5.1 lid2h zorgen wij voor het toepassen van de meest geschikte biomarkers voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen binnen de projectvergunning.

### **Kennis m.b.t. gevoerde nutriënten**

- Er zijn nog veel voerstrategieën waarvan we verwachten dat ze een preventieve of onderdrukkende werking kunnen hebben op het ziektebeeld van S. suis. Uit *in vitro* onderzoek is gebleken dat voerstrategieën de potentie hebben om het ziekteverwekkende vermogen van S. suis te kunnen beïnvloeden. Voorbeelden van voerstrategieën die met succes *in vivo* onder de vorige vergunning getest zijn:
  - Een mengsel van korte keten en middelketen lange vetzuren in vrije vorm was in staat om S. suis kolonisatie te verminderen. Daarnaast worden middelketen lange vetzuren in vrije vorm toegevoegd aan het voer, omdat dit effectiever bleek dan het toevoegen van middelketen lange triglyceriden in een olie.
  - Een combinatie van glyceriden van vetzuren toegevoegd aan het voer en drinkwater van biggen verminderde de S. suis concentratie in de darm.
  - Grotere deeltjes van grondstoffen, t.g.v. aanpassing van het voerproductieproces, resulteerde in een lagere pH in de maag (en tot een lagere variatie in pH), waardoor er minder S. suis in het ileum gevonden werd.
  - Ook bleek op 5.1 lid2h dat een mix van organische zuren in het drinkwater van gespeende biggen de kolonisatie van S. suis op de tonsillen kan verminderen.
- De EU moedigt 5.1 lid2h aan om preventieve maatregelen voor E. coli infecties te vinden, met als uiteindelijke doel antibiotica gebruik en toevoeging van hoge gehalten aan zink in het voer te verminderen. Voorbeelden van voerstrategieën die tot op heden met succes getest zijn:
  - Gesproeidroogd varkensplasma als alternatieve eiwitbron in plaats van magere melkpoeder verhoogde de voeropname en groei, verbeterde de mestscore en verminderde de kolonisatie van E. coli in de biggen.
  - Door grondstoffen te behandelen (bijv. verhitten) kunnen anti-nutritionele factoren worden geïnactiveerd en kan de weerbaarheid tegen E. coli verbeterd worden.
  - Fermentatieproducten van bepaalde Lactobacillus stammen bleken een effectief alternatief voor hoge concentraties van zink oxide om E. coli infecties te voorkomen.
  - Het toevoegen van een levende gist aan het voer verbeterde de mestscore en verminderde de E. coli concentraties in de darm en in de mest.
  - Verschillende complexe synbiotica (combinatie pro- en prebiotica) kunnen de groei van gespeende biggen na E. coli besmetting aanzienlijk kan verbeteren. Ook een op zichzelf



staand probioticum was in staat om de mestscore en groei van de biggen na E. coli besmetting te verbeteren.

- Voorbeelden van voerstrategieën die met succes getest zijn omtrent het bevorderen van de immuun competentie van biggen:
  - Harszuren uit naaldbomen hebben een anti-inflammatoire werking en leidden tot een lagere ontstekingsreactie bij de biggen wanneer toegevoegd aan het voer.
  - Ook is gebleken dat het gebruik van een organische selenium bron in het voer in plaats van een anorganische selenium bron een positief effect had op de immuun respons van gespeende biggen na immuun stimulatie.

De opbrengsten zijn effectieve voerstrategieën voor gespeende biggen om E. coli en S. suis te verminderen en de immuun competentie van de biggen te verhogen. Deze voerstrategieën kunnen ingezet worden naast de hygiëne maatregelen en overige preventie maatregelen, waaronder o.a. stressvermindering en (auto)vaccins.

### **Kennis m.b.t de invloed van zeugen**

Verworven kennis omtrent de invloed van zeug op big in de afgelopen jaren heeft in nieuwe inzichten voor de huidige projectaanvraag geresulteerd:

- In een gezamenlijk project om S. suis infecties te verminderen is op een collega [5.1 lid2h](#) gebleken dat biggen kort na de geboorte reeds S. suis bij zich kunnen dragen op de tonsillen. Omdat S. suis tijdens de geboorte of tijdens het zogen van de zeug naar de biggen overgedragen kan worden, en de kolonisatie van de big in het vroege leven grotendeels beïnvloed wordt door de zeug en de wijze waarop zij gevoerd wordt, biedt het veel perspectief om de voeding van zeugen mee te nemen in het gebruikte S. suis model.
- Recent onderzoek van [5.1 lid2h](#) laat zien dat biggen die later wel of geen diarree ontwikkelen reeds verschillen in microbiota samenstelling op 1 week na de geboorte. Dit geeft aan dat de kolonisatie van de darm in het vroege leven van de big een belangrijke rol speelt in het latere risico op diarree. Om die reden worden door [5.1 lid2h](#) in het eerder benoemde EU-project momenteel verschillende voerstrategieën rondom het werpen van de zeug en in het voer van de zogende biggen getest. Voorbeelden hiervan zijn:
  - Het aandeel fermenteerbare en inerte vezels: met als doel de darmgezondheid van de biggen te verbeteren en E. coli infecties te voorkomen.
  - Daarnaast is door [5.1 lid2h](#) onderzocht dat 'faecal microbiota transplantation' (inoculatie met mest van gezonde donor) in pasgeboren biggen de darm microbiota kan veranderen en de potentie heeft om ziektegevoeligheid voor E. coli na het spenen te verminderen.

Kortom zijn er zeer sterke aanwijzingen vanuit eigen onderzoek en onderzoek binnen samenwerkingen van [5.1 lid2h](#) gekomen dat het nuttig is om al vroegtijdig, dus bij voeding en management van de zeug en zogende biggen, in te grijpen om S. suis en E. coli kolonisatie na het spenen te verminderen. Daarom worden in het huidige projectvoorstel ten opzichte van het vorige projectvoorstel niet alleen voerstrategieën bij gespeende biggen beschreven, maar wordt ook de voeding van de zeug en zogende biggen meegenomen in alle drie de bijlagen (E. coli, S. suis, immuun competentie).

**- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?**

Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD. Dat rekening gehouden wordt met de wettelijke eisen omtrent hergebruik is toegevoegd onder het kopje 'H. hergebruik'.

Binnen huidig project wordt het ongerief bij de zeugen nooit hoger dan gering, omdat in de beschreven modellen niet de zeugen zelf, maar alleen hun biggen worden ingezet. Zeugen worden wel gevoerd met specifieke voeders en zij worden bemonsterd ter bepaling van het werkingsmechanisme.

Zeugen zullen alleen ingezet worden in proeven binnen huidig project wanneer:

- De voorgaande dierproef/dierproeven gepaard gingen met licht of hooguit matig ongerief van de zeug.
- De gezondheid, het welzijn en productiviteit van de zeug bij het indelen van de proef volledig is hersteld na de voorgaande dierproef/dierproeven. Hierbij wordt ook rekening gehouden met de duur tussen de monsternames uit de voorgaande en de huidige proef. De dieren worden qua gezondheid altijd nauwkeurig gemonitord en zo nodig behandeld conform diergeneeskundig advies. Bij twijfel worden ze niet ingezet in onderzoek.
- De te verrichten handelingen aan de zeugen in de dierproef zullen niet de levensloop van het dier negatief beïnvloeden. Afhankelijk van het te verwachten werkingsmechanisme van de gevoerde voer(productie)strategie of voeradditief aan de zeug, gaat het om de volgende handelingen: swabs (rectaal, vaginaal, tonsil en/of neus; max. 4x per proef), mestmonsters (max. 4x per proef), bloedmonsters (max. 3x per proef) en/of biestmonsters (max. 1x per proef). Het gaat met name om het verstrekken van proefvoerders aan de zeugen om de darmgezondheid en het immuunsysteem van hun biggen te beïnvloeden.

**- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee minder leefruimte zullen hebben dan de minimaal voorgeschreven oppervlakte in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.**

Momenteel is **5.1 lid2h** bezig met het vervangen van alle kraamhokken voor een type kraamhok met grotere afmeting en meer comfort, een vrijloopsysteem. Onderzoek onder de huidige projectaanvraag zal niet meer plaatsvinden in de kraamhokken met genoemde afmeting in bovenstaande vraag, maar in huisvesting met een afmeting die voldoet aan richtlijn 2010/63/EU. Dit is aangepast in de bijlagen onder 'C. Huisvesting en verzorging'

Hieronder lichten we de nieuwe kraamhokken verder toe:

In het nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen (5,0 m<sup>2</sup>), en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m). De reden om de eerste dagen na het werpen af te wijken van de richtlijn is om biggensterfte te minimaliseren. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt door het gaan liggen van de zeug. De biggen hebben beschikking over het gehele kraamhok (2,50 x 2,66m). U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek. Hieronder vindt u twee impressiefoto's van het vrijloopsysteem op onze onderzoeksfaciliteit.





**- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is onvoldoende navolgbaar in de bijlagen. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten zodat uit de bijlagen blijkt hoe het aantal dieren tot stand komt.**

Om de powerberekeningen verder toe te lichten hebben wij in ons antwoord de informatie gevraagd onder de volgende twee koppen per bijlage beter aan elkaar gekoppeld:

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

- 'B. De dieren, aantal'

Voor de powerberekeningen wordt gebruikt gemaakt van data uit voorgaande proeven op [5.1 lid2h](#) en wordt een significant niveau van  $\alpha < 0,05$  en een power van 0,80 aangehouden. Er wordt gewerkt met het minimaal benodigde aantal dieren. Bij de powerberekeningen worden de primaire uitkomstparameters gebruikt.

Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1 bijlages):

Per IvD aanvraag / werkprotocol dat beoordeeld wordt door de Instantie voor Dierwelzijn, zal de meest geschikte uitkomstparameter(s) beargumenteerd worden op basis van de in te zetten voerstrategie en zal het aantal benodigde zeugen (gemiddeld 10-15) voor bemonstering worden berekend in een poweranalyse. Dit gaat dan bijv. om het nemen van mestmonsters bij de zeugen ter bepaling van vluchtige vetzuren of om swabs (rectaal, vaginaal, tonsil en/of neus) ter bepaling van het microbiom.

Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1 bijlages):

- In de E. coli kolonisatietest is de primaire uitkomstparameter de uitscheiding van E. coli in de mest (in log CFU E. coli/g mest) en de mestconsistentie. Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 10-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van E. coli en in mestconsistentie. In totaal gaat het om 900 biggen die (zowel voor als) na spenen ingezet worden: gemiddeld 3 proeven per jaar x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 dieren = 180 biggen x 5 jaar = 900 biggen.

- In de S. suis kolonisatietest is de primaire uitkomstparameter de kolonisatie van S. suis in het ileum (in log CFU S. suis/ml darminhoud). Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van S. suis. In totaal gaat het om 600 biggen die (zowel voor als) na spenen ingezet worden: gemiddeld 2 proeven per jaar x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 dieren = 120 biggen x 5 jaar = 600 biggen.

- In de LPS immuun competentie test zijn de primaire uitkomstparameters acute fase-eiwitten en cytokines. Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in acute fase-eiwitten en cytokines. In totaal gaat het om 360 biggen die (zowel voor als) na spenen ingezet worden: gemiddeld 1 proef per jaar x 6 behandelingen x 12 dieren = 72 biggen x 5 jaar = 360 biggen.

Dit zijn biggen in de ongeriefsklasse matig.

Indien onderzoek wordt gedaan waarbij de invloed van het voer bij zogende biggen getest wordt, is het van belang dat na het spenen biggen ingezet worden die een constant en hoog voeropnameniveau voor spenen hebben gehad. Er zullen extra biggen tot spenen ingezet worden om biggen met dit kenmerk te kunnen uitslecteren of om de invloed en het werkingsmechanisme van de voerstrategie (bij zeug of zogende biggen) vóór het spenen te bepalen. Dit zijn biggen in de ongeriefsklasse gering, omdat deze "extra" biggen niet in het infectiemodel worden ingezet. Om dit aantal benodigde dieren te berekenen worden gegevens uit eerdere proeven op [5.1 lid2h](#) (onder AVD [5.1 lid2h](#)) of uit de literatuur gebruikt.

**- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de humane eindpunten in iedere bijlage concreter te formuleren, zodat duidelijk blijkt wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.**

We hebben de humane eindpunten per type onderzoek concreter geformuleerd per bijlage onder 'E. Humane eindpunten'. De informatie is tevens hieronder weergegeven:

### **Humane eindpunten bij Streptococcus suis onderzoek**

We verwachten matige klinische verschijnselen na *S. suis* inoculatie. De matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn een verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte kreupelheid, (indien veroorzaakt door *S. suis* ten gevolge van gewrichtsontsteking). Hoewel er een mild pathogene stam van *S. suis* gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan *S. suis* ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de *S. suis* inoculatie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten voor 4 dagen na *S. suis* inoculatie en worden de biggen minimaal driemaal daags (ochtend, middag en avond) gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 4 dagen na inoculatie. Vanaf dag 5 na inoculatie worden de dieren tweemaal daags (ochtend en middag) gecontroleerd op klinische verschijnselen. Als er dan in de middag matige symptomen worden waargenomen, wordt er een aanvullende waarneming in de avond gedaan (en wordt in dat geval 3x daags gecontroleerd). Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden bij *S. suis* zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. We verwachten slechts bij hoge uitzondering (0-3%) een humaan eindpunt te bereiken. *S. suis* kent geen milde klinische symptomen. Hieronder worden de matige en ernstige symptomen weergegeven:

Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:

- Trage reactie van een big
- Rectale temperatuur  $>40^{\circ}\text{C}$  (\*)
- Verhoogde ademhaling ( $>50$  per min.), meestal als gevolg van koorts.
- Zichtbare kreupelheid aan 1 poot waarbij de gewrichten niet gezwollen zijn en het dier deze nog wil belasten

Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

\*Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur  $>40^{\circ}\text{C}$  zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van  $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$  heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.

Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan *S. suis* gerelateerd zijn:

- Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging
- Duidelijke symptomen van hersenverschijnselen die wijzen op meningitis, zoals
  - Evenwichtsstoornissen
  - Slechte coördinatie
  - Kopschudden,
  - Op 1 zijde liggen,
  - Snelle oogbewegingen,
  - Gestrekte nek, opisthotonus

- Duidelijke symptomen van sepsis, zoals de combinatie van een rectale temperatuur >40°C en niet aan te sporen tot beweging.
- Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen
- Ernstige kreupelheid aan 1 of meer gewrichten waarbij het gewricht zichtbaar gezwollen is en het dier deze niet meer wil belasten / niet meer wilt lopen (artritis / poly-artritis)
- Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie

De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

### **Humane eindpunten E. coli onderzoek**

We verwachten milde klinische verschijnselen na E. coli inoculatie. De milde klinische verschijnselen die we verwachten zijn diarree, een verminderde voeropname en verminderde activiteit (maar wel alert). Hoewel er een mild pathogene stam van E. coli gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan E. coli ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de E. coli inoculatie daarom goed te controleren wordt er op de 5 opeenvolgende dagen na de inoculatie, de rectale temperatuur van de biggen eenmaal daags gemeten, de individuele mestconsistentie eenmaal daags bepaald en worden de biggen driemaal daags (ochtend, middag en avond) gecontroleerd op klinische verschijnselen. Vanaf dag 6 na inoculatie worden de dieren tweemaal daags (ochtend en middag) gecontroleerd op klinische verschijnselen. Als er dan in de middag matige symptomen worden waargenomen, wordt er een aanvullende waarneming in de avond gedaan (en wordt in dat geval 3x daags gecontroleerd). Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. We verwachten slechts bij hoge uitzondering (0-2%) een humaan eindpunt te bereiken.

#### Milde symptomen:

- (Waterdunne) Diarree
- Verminderde voeropname
- Verminderde gewichtstoename
- Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")

Bij milde symptomen zonder dat één van de onderstaande matige of ernstige symptomen voor het maximale aantal waarnemingen optreedt zal het dier in de proef blijven.

#### Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:

- Matige uitdrogingsverschijnselen, zoals een rimpelige huid
- Trage reactie van een big
- Big trilt en biggen liggen op/tegen elkaar
- Rectale temperatuur >40°C (\*)
- Verhoogde ademhaling (>50 per min.), meestal als gevolg van koorts
- Overgeven

Bij het optreden van matige symptomen zal de huid turgor en slijmvliezen gecontroleerd worden. Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

\* Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur >40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van  $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$  heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.

Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan E. coli gerelateerd zijn:

- Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging
- Rectale temperatuur <39 °C
- Ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor (huidplooi blijft staan) of diep ingevallen ogen
- Afwijkende kleur van de slijmvliezen
- Bloederige diarree
- Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie
- Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen

De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

### **Humane eindpunten bij LPS onderzoek**

In principe wordt er geen humaan eindpunt verwacht (0-1%). We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen vanaf ongeveer 30 minuten na LPS injectie tot 4 uur na LPS injectie. De kortdurende milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur (>40°C). Hoewel er een lage dosering van LPS gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de LPS injectie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen gemeten op de dag van (meermaals per dag wanneer het dier klinische symptomen vertoont) en de dag na de LPS injectie en worden de biggen driemaal binnen 24u na de LPS injectie gecontroleerd op klinische verschijnselen.

Milde tot matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:

- Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")
- Verminderde voeropname
- Rectale temperatuur >40.5°C
- (Waterdunne) Diarree
- Speekselen

Bij 2 waarnemingen van een rectale temperatuur >41°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander mild tot matig symptoom van toepassing is. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben (>40.5°C) en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.

Ernstige symptomen:

- Big is niet aan te sporen tot eten en drinken
- Wanneer de big niet wil opstaan, plat blijft liggen

De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

Wij hopen met deze brief meer duidelijkheid te hebben gegeven op uw vragen.



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- 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 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.



## Aanleiding

Deze aanvraag met betrekking tot drachtige en lacterende zeugen en hun biggen is een vervolg op de projectvergunning AVD5.1 lid2h . Hierin worden 5.1 lid2h voor zeugen en biggen onderzocht die een preventieve werking hebben op het gebied van bacteriële ziekten of een suboptimaal werkend immuunsysteem bij biggen rondom het spenen. Het project heeft als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen de belangrijkste infectieuze aandoeningen binnen de varkenshouderij te verbeteren door middel van voer-oplossingen. Hierdoor zijn dieren beter bestand tegen deze frequent voorkomende infecties. Zo kan curatief ingrijpen vaker voorkomen worden.

Het doel is daarbij om veilige en effectieve alternatieven beschikbaar te krijgen voor het gebruik van antibiotica en hoge doseringen aan mineralen in het voer van biggen. Op deze wijze kan diergezondheid en dierenwelzijn van biggen gewaarborgd worden en het milieu gespaard worden.

## Terminologie:

- Microbioom: Het geheel aan symbiotische micro-organismen die in en op een gastheer leven.
- Tonsillen (= keelamandelen): Lymfeklierweefsel gelegen achter in de keelholte op de grens tussen het ademhalingsstelsel en maagdarmkanaal met een belangrijke functie in het immuunsysteem
- Voer(productie)strategieën: grondstofkeuze, nutriëntverhoudingen en fysische eigenschappen van het voer door aanpassingen in het productieproces (zoals deeltjesgrootte van grondstoffen, het ontsluiten van grondstoffen en hardheid van de korrel) door aanpassingen in het productieproces.
- Voeradditieven: toevoegingsmiddelen in voer of drinkwater om diergezondheid te verbeteren. De additieven die getest zullen worden, zijn stoffen, micro-organismen of preparaten die geen voedermiddelen of diergeneesmiddelen zijn. In incidentele proeven gaat het om nieuwe technologieën, zoals inoculatie met darmbacteriën, en supplementen welke niet via voer of drinkwater toegediend kunnen worden, en daardoor via de bek of rectaal ingebracht dienen te worden om hun effect op de microbiota (in de darm en de tonsillen = keelamandelen) en het maag-darmkanaal uit te kunnen oefenen. Het gaat dan om bijvoorbeeld eenmalig toe te dienen stoffen of supplementen voor bijvoorbeeld pasgeboren of zogende biggen, om dat deze nog niet of nauwelijks voer of water opnemen.

## Achtergrond en context

### *Verbeteren diergezondheid en dierenwelzijn*

Binnen dit project richten we ons op het functioneren van het immuunsysteem en op twee zeer belangrijke infectieuze ziekteverwekkers bij biggen, namelijk Escherichia coli (*E. coli*, maagdaandoening) en Streptococcus suis (*S. suis*, luchtwegaandoening). Volgens de gegevens van de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD), het instituut dat pathologisch onderzoek verricht op dieren die vanuit de Nederlandse praktijkbedrijven ingestuurd worden, is in de afgelopen jaren het percentage inzendingen waarbij een maagdaandoening of luchtwegaandoening is vastgesteld, gestegen. De meeste gezondheidsproblemen bij gespeende biggen worden in Nederland toegeschreven aan Streptokokken (nr. 1 met 42%) en *E. coli* (nr. 2 met 8%). Bovendien is volgens data van dit instituut (GD, 2018) *E. coli* met 30% de meest gestelde diagnose voor maagdaandoeningen bij varkens.

Zowel *E. coli* als *S. suis* bacteriën kunnen leiden tot ernstige ziekteverschijnselen en zij zijn verantwoordelijk voor een groot deel van de biggensterfte (Van der Peet-Schwing, 2008; GD Deventer, 2018). Deze ziektes beïnvloeden daarmee diergezondheid en dierenwelzijn negatief. 80% van de Europeanen is van mening dat het dierenwelzijn beter moet worden beschermd dan nu het geval is (Europese Commissie, 2016). In de 'Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023' (2013) is dan ook afgesproken om in de periode naar 2023 toe concrete resultaten in Nederland te boeken voor wat betreft diergezondheid en dierenwelzijn. Hoewel het infectieverloop van *E. coli* en *S. suis* steeds beter bekend zijn, zijn er nog weinig effectieve preventieve maatregelen.

### *Verlaging van gebruik van antimicrobiële middelen*

Ondanks het feit dat diagnoses voor het inzetten van antibiotica niet centraal worden vastgelegd, is het plausibel dat *S. suis* een belangrijke indicatie is voor het inzetten van penicillines (KNMVD, 2014; GD, 2017) en *E. coli* voor het inzetten van colistine (SDa, 2020). Door het antibioticagebruik in de veehouderij te verminderen kan het ontstaan van antibioticaresistenties beperkt worden. Dit is van belang voor dieren- en volksgezondheid, omdat resistente bacteriën van dieren op mensen overgedragen kunnen worden. Dit project draagt daarom indirect bij aan het duurzaamheidsdoel 'volksgezondheid' van de Nederlandse

veehouderij (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023, 2013). Daarnaast is *S. suis* een zoönose, die ook op directe wijze de volksgezondheid in gevaar kan brengen. Als er minder dieren besmet worden met *S. suis*, is het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens. In Europa komen *S. suis* infecties met name voor bij dierenartsen, varkenshouders en slachthuismedewerkers (Elbers et al., 1999; Strangmann et al., 2002). In Zuid-Oost Azië en China beperken de *S. suis* infecties zich niet tot deze beroepen en zijn er uitbraken van *S. suis* geweest. In Vietnam is *S. suis* zelfs de belangrijkste veroorzaker van hersenvliesontsteking bij de mens (Trung et al., 2012). Door kennis over de preventie van *S. suis* infecties bij varkens uit te dragen naar nationale en internationale klanten dragen we bij aan het verlagen van het risico op deze zoönose.

Alhoewel de varkenssector erin geslaagd is het totale antibioticagebruik in de varkenshouderij in 2019 te verlagen ten opzichte van 2018, steeg het gebruik van antibiotica die ingezet wordt bij *E. coli* infecties (SDa, 2020). Deze stijging is te koppelen aan het verlagen van het maximumgehalte van mineralen zoals zink (Zn) en koper (Cu) in biggenvoeders.

Zink en koper werden en worden met succes ingezet in hoge doseringen in biggenvoeders met het doel om een sterke daling in kolonisatie van pathogenen en een positief effect op de darmfysiologie (bijvoorbeeld minder villusatrofie na het spenen) te bewerkstelligen. Echter, op basis van de negatieve effecten die Zn en Cu op het milieu hebben, heeft de EU het maximaal toegestane gebruik van Zn en Cu in biggenvoeders beperkt vanaf respectievelijk 2016 (EU 2016/1095) en 2018 (EU 2018/1039). Tevens geeft de EU in deze uitvoeringsverordeningen aan dat er geanticipeerd moet worden op een verdere verlaging van Zn en Cu gehalten bij de volgende herziening (zoals geadviseerd door de EFSA FEEDAP Panel, 2014; 2016). De EU moedigt onderzoekinstellingen aan om snel het gebruik en de doeltreffendheid van alternatieven voor de toevoeging van Zn en Cu te onderzoeken. Vanaf 2022 zal het in de EU verboden zijn om Zn in farmaceutische gehalten toe te voegen aan speenvoeders. Hoewel dit in Nederland al sinds mei 2018 verboden is, moeten sommige andere Europese landen, bijvoorbeeld Denemarken, nog volgen. Om de infectiedruk onder controle te houden is het daarom van essentieel belang om effectieve preventieve maatregelen tegen infectieuze ziekten te zoeken in o.a. de voeding. Hierdoor kunnen concrete stappen tot verduurzaming gezet worden om de bodem- en waterkwaliteit in Nederland te verbeteren (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023, 2013).

### **De invloed van de voeding van zeug en zogende big op darmgezondheid en het immuunsysteem.**

In onderzoek uitgevoerd in de afgelopen jaren onder projectvergunning AVD [5.1 lid2h](#) en in internationaal onderzoek is gezien dat de gezondheid en voeding van de zeug van grote invloed kan zijn op het microbioom van het maagdarmkanaal en de voorste luchtwegen bij haar nakomelingen. Vanaf geboorte tot ongeveer 2 weken na spenen is de microbiota samenstelling in de darm nog volop in ontwikkeling, en nog niet stabiel (Guavarra et al., 2019), waardoor deze gemakkelijk uit balans kan raken. Biggen met en zonder spendiarree als gevolg van *E. coli* besmetting bijvoorbeeld, verschillen niet alleen tijdens de diarree-periode in hun microbiota samenstelling, maar hun darm microbiota is al verschillend enkele weken voor het begin van de diarree, in de periode vóór het spenen ([5.1 lid2h](#), 2019; Dou et al., 2017). Dit geeft aan dat de darmkolonisatie een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van diarree en dat de darm microbiota in het 'vroege leven' van de biggen het latere risico op diarree kan beïnvloeden. De darmkolonisatie in het vroege leven wordt grotendeels beïnvloed door de zeug. Biggen worden namelijk relatief steriel geboren, waarbij ze de microbiota van de zeug meekrijgen tijdens geboorte (uit de mest en geboorte kanaal) en na geboorte (via colostrum, melk, huid en mest). Op de dag van geboorte is er dan ook een grote overeenkomst in de darm microbiota van de zeug en haar biggen. Dit biedt mogelijkheden om de kolonisatie van darmbacteriën van de biggen te moduleren via voerstrategieën bij de zeug rondom het werpen.

Ook *S. suis* kan reeds tijdens de geboorte (Amass et al., 1996) of tijdens het zogen van de zeug naar de biggen worden overgebracht. Daarnaast kunnen biggen de bacterie op elkaar overdragen in kraamstal of gespeende biggenstal (Dekker et al., 2013). Kolonisatie van *S. suis* in een gezonde big kan plaatsvinden zonder dat het dier ziek wordt (ontstaan van zogenaamde dragers).

Uit eerder onderzoek binnen [5.1 lid2h](#) is gebleken dat het voor een deel van de voerstrategieën en additieven zinvol kan zijn om de voeding van zeugen en zogende biggen mee te nemen in de gebruikte modellen. Daarom worden in dit projectvoorstel niet alleen modellen bij gespeende biggen beschreven maar ook modellen waarbij de voeding van de zeug en zogende biggen reeds meegenomen wordt. Voor de praktijk is het haalbaar en nuttig om al vroegtijdig, dus bij voeding en management van de zeug en zogende biggen in te grijpen zodat dierziektes preventief kunnen worden aangepakt. In dit kader kan ook de interactie van voerconcepten met vaccinaties volgens de reguliere praktijk meegenomen worden in het onderzoek.

### Escherichia coli infecties

Escherichia coli (E. coli) is een gram-negatieve bacterie, welke zich koloniseert in het maag-darmkanaal. E. coli infecties kunnen zich uiten in diarree in de eerste week na geboorte (18% van de gezondheidsproblemen bij zogende biggen), waarbij vaak de hele toom ziek is. Daarnaast komt het veel voor in de eerste 2 weken na het spenen (nr. 2 van de gezondheidsproblemen bij gespeende biggen).

De darm microbiota kunnen door veranderingen in de omgeving, zoals het spenen, uit balans raken. Door verandering in voer en stress op het moment van spenen eet een big tijdelijk niet tot zeer weinig. Als het dier daarna weer begint met eten, krijgt de E. coli bacterie de kans zich te vermenigvuldigen onder invloed van aanwezigheid van veel onverteerd substraat in de darm en een onbalans in microbiota samenstelling. Om ziekte te veroorzaken moet de E. coli zich via aanhechtingsfactoren (zoals F4) aan de wand van de dunne darm hechten. Vervolgens produceert hij toxines (zoals hitte labiel/stabiel toxine) welke de darmcellen aantasten, wat resulteert in een verminderde absorptie en toename van vochtverlies via de darm. Kenmerkend voor een E. coli infectie is (waterige) diarree, verminderde absorptie door aantasting van de darmvilli (bij gespeende biggen), verminderde groei, en sterfte door uitdroging.

### Preventie van E. coli infecties door middel van voeding

Onderstaand worden enkele voorbeelden beschreven van voer(productie)strategieën en additieven die op het moment van schrijven het meeste perspectief bieden om via voeding invloed uit te oefenen op E. coli bacteriën en hun toxines:

- *Voer(productie)strategieën:*
  - Grondstofkeuze, nutriëntverhoudingen en fysische eigenschappen van het voer kunnen van grote invloed zijn op het voorkomen van E. coli infecties.  
Hierbij kan gedacht worden aan verlaging van het eiwitgehalte rondom spenen, het toevoegen van prebiotica zoals voedingsvezels en bijvoorbeeld het optimaliseren van het aandeel aan fermenteerbare en inerte koolhydraten (5.1 lid2e 2014). Hierbij is ook het moment waarop (bijvoorbeeld rondom werpen) niveaus aan koolhydraten hoger ofwel lager zijn van belang (Cheng et al. 2018, Feyera et al. 2017). De werkingsmechanismen die van belang zijn binnen deze strategische wijzigingen in nutritionele kenmerken kunnen variëren: de darm microbiota samenstelling kan bijvoorbeeld wijzigen, de darm barrière functie kan verbeterd worden of de kwaliteit en/of kwantiteit van de colostrum kan verbeteren. Ook de verteerbaarheid van nutriënten en aanwezigheid van antinutritionele factoren (ANF's) in grondstoffen spelen een rol. ANF's, bijvoorbeeld glucosinolaten in raapzaad en alkaloiden in aardappelwit (Liener et al. 1994) kunnen een irriterend effect hebben op de darmwand hebben of de verteerbaarheid negatief beïnvloeden. Door grondstoffen met ANF's te behandelen (verhitten, extractie, concentraat) kunnen ANF's worden geïnactiveerd en kan de weerbaarheid tegen E. coli worden verbeterd.
- *Additieven, bijvoorbeeld:*
  - *Organische zuren:* Ook organische zuren zouden een positief effect kunnen hebben op het voorkomen van E. coli infecties (Jiménez et al., 2020; Suiryanrayna and Ramana, 2015; Tsiloyiannis et al., 2001), door de positieve invloed op vertering van nutriënten en hun antimicrobiële functie.
  - *Probiotica en fermentatieproducten:* Probiotica zijn levende bacteriën en gisten (bijv. Saccharomyces cerevisiae: Trevesi et al., 2015, 2017) die een positief effect op de gezondheid hebben wanneer ze in voldoende hoeveelheden worden geconsumeerd. Via verschillende routes kunnen probiotica E. coli infecties voorkomen (Dubreuil, 2017; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2016). Dit kan via competitie op het gebied van aanhechting aan de darmwand of voor het beschikbare voedsel in de darm, productie van antimicrobiële bestanddelen zoals bacteriotoxinen en effecten op het immuunsysteem. Onder andere op 5.1 lid2h is gebleken dat probiotica ook de vertering van nutriënten kunnen verbeteren, waardoor er minder beschikbaar voedsel is voor E. coli om zich te vermeerderen. Het succes van probiotica in de preventie van E. coli infecties is o.a. afhankelijk van de gebruikte micro-organismen en hun interactie met de voercomponenten. Uit onderzoek van 5.1 lid2h is ook gebleken dat fermentatieproducten van bepaalde Lactobacillus stammen als alternatief voor hoge concentraties van zink oxide ingezet zou kunnen worden om E. coli infecties te voorkomen (5.1 lid2h, 2017).
  - *Orale antilichamen:* Orale antilichamen kunnen voorkomen dat de E. coli zich kan hechten aan de dunne darm (Viridi et al., 2013; 2019).

### **Streptococcus Suis infecties**

Streptococcus suis (S. suis) is een gram-positieve bacterie. Deze bacterie kan op verschillende manieren en momenten overgedragen worden, namelijk

- direct van zeug op big tijdens de geboorte en tijdens het zogen
- tussen biggen onderling in kraamstal en gespeende biggenstal
- via materialen
- via de lucht en
- via mensen

S. suis (serotype 2) is ook een zoönose. Dit betekent dat bij overdracht van de bacterie van varkens(vlees) op mensen, mensen ernstige ziekteverschijnselen kunnen krijgen, zoals bijv. hersenvliesontsteking.

De S. suis bacterie komt voor in de bovenste luchtwegen (hecht voornamelijk aan de tonsillen en neusholtes), het genitaal stelsel en het maag-darmkanaal van varkens. Kolonisatie van S. suis in een gezonde big kan plaatsvinden zonder dat het dier ziek wordt (dier wordt dan drager genoemd). Echter, bij kolonisatie van een virulente stam van S. suis (overdracht via een besmet varken met virulente S. suis stam in de groep) of bij een verminderde afweer van het dier (bijv. door een virus infectie, stress van spenen, transport stress, verandering in voer) kunnen deze bacteriën op later moment leiden tot ernstige klinische verschijnselen. Zo zorgt bijvoorbeeld E. coli besmetting voor verzwakking van de weerstand van biggen, waardoor er gemakkelijker een S. suis infectie kan opspelen, bijvoorbeeld na het spenen. Rondom spenen is de prevalentie van S. Suis infecties dan ook het hoogst.

De pathogenese van S. suis wordt tot dusver nog niet volledig begrepen. De eerste stappen van infectie zijn bacteriële kolonisatie (hechting en vermeerdering), waarna translocatie over de epitheliale barrière plaatsvindt naar de circulatie toe, gevolgd door verspreiding naar verschillende organen. Bij varkens speelt de kolonisatie van de bovenste luchtwegen waaronder de tonsillen (Gaiser et al., manuscript in voorbereiding) en het maag-darmkanaal een belangrijke rol bij infecties van S. suis bij biggen (Wertheim et al., 2009; Su et al., 2008).

Voedingsstoffen, voornamelijk koolhydraten, in de mondholte en het maag-darmkanaal worden door S. suis bacteriën gebruikt om zich te vermeerderen. Wanneer S. suis in de circulatie terecht komt, kunnen de bacteriën zich aanhechten aan de endotheelcellen van bijvoorbeeld de bloedhersenbarrière, gewrichten of hartkleppen leidend tot hersenvliesontsteking, gewrichtsontsteking of hartklepontsteking en secundair longontsteking. Ook kunnen de bacteriën aanleiding geven tot een ongereguleerde afgifte van ontstekingsmediatoren vanuit de lever, wat meestal leidt tot plotselinge sterfte. Vooral hersenvliesontsteking gaat vaak gepaard met koorts, waardoor biggen met hersenvliesontsteking snel kunnen uitdrogen en plots dood kunnen gaan. Biggen met minder ernstige symptomen van een S. suis infectie maken een zieke indruk, hebben weinig eetlust, lopen moeilijk en hebben koorts. S. suis infecties kunnen snel (binnen 24 uur) leiden tot tientallen sterftegevallen, waardoor tijdig ingrijpen van groot belang is. De acute vorm kan ook overgaan tot een chronische vorm met blijvende kreupelheid. Tot op heden is er geen commercieel vaccin beschikbaar dat effectief beschermt tegen alle S. suis-serotypen. In Nederland wordt wel door diverse zeugenbedrijven preventief gevaccineerd met een bedrijfsspecifiek vaccin (autovaccin).

### **Preventie van S. suis infecties door middel van voeding**

Omdat S. suis o.a. in de darmen, het speeksel en op de tonsillen voorkomt zijn er mogelijkheden om S. suis infecties te voorkomen door middel van voer(productie)strategieën en voeradditieven. Onderstaand worden enkele voorbeelden beschreven van strategieën en additieven die op het moment van schrijven het meeste perspectief bieden:

- *Voer(productie)strategieën:*

S. suis groeit het beste op koolhydraten en zetmeel, waardoor een andere voersamenstelling het beschikbare voedsel voor S. suis en daardoor de groei ervan zou kunnen verminderen. Welke voercomponenten (bijv. monosachariden, disachariden of polysachariden) exact een rol spelen in de virulentie van S. suis is nog onbekend (Ferrando et al., 2014). Daarnaast lijkt 'overprocessing' van zetmeel invloed te hebben op de groei van S. suis (5.1 lid2h, 2018).

- *Additieven, bijvoorbeeld:*

- *Middelketen lange vetzuren:* Er zijn aanwijzingen dat middelketen lange vetzuren in het voer door hun directe antimicrobiële effect de groei van S. suis zouden kunnen remmen (Jackman et al., 2020; Dierick et al., 2002).
- *Organische zuren:* Een mix van organische zuren in het drinkwater van gespeende biggen kan de kolonisatie van S. suis op de tonsillen verminderen (5.1 lid2h, 2020) door de maag pH laag te houden

- *Probiotica*: Probiotica gegeven aan zeugen of zogende biggen (via oraal supplement) zouden de microbiota ontwikkeling van biggen zo kunnen beïnvloeden dat *S. suis* zich niet kan koloniseren ('competitive exclusion' genoemd).

Onderzoek voor wat betreft preventie van *S. Suis* is volop in ontwikkeling, dus ook andere voeroplossingen kunnen waarschijnlijk perspectief bieden in de preventie van *S. suis*, zoals bijvoorbeeld producten die de hoeveelheid onverteerd substraat in de darm laag kunnen houden en die de darm barrière functie kunnen versterken.

### **Een verminderde immuun competentie: ontstekingsreacties en oxidatieve stress**

Immuun competentie omvat het vermogen van een dier om adequaat te reageren op immunologische bedreigingen. Het dier beschikt over een arsenaal aan verdedigingsmechanismen tegen bedreigingen, die samen dit vermogen bepalen. De immuun competentie van een dier wordt mede bepaald door de interactie tussen voer, de darm microbiota en de cellen van het immuun systeem in de darmwand.

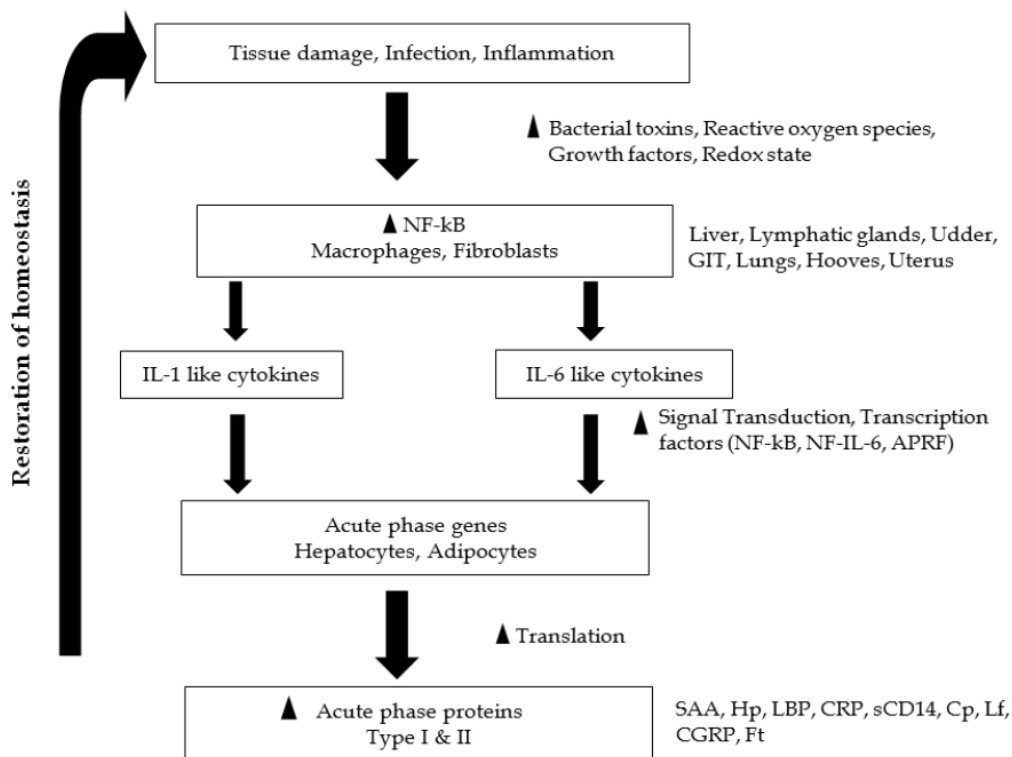
In de dunne darm zit 70-80% van de immuuncellen (Furness et al., 1999; Vighi et al., 2008) en ook de immuunactivatie en het imprinten van het immuunsysteem bij jonge dieren vindt hier plaats (bijv. Clarke, et al., 2010; Hall et al., 2008; Smith et al., 2007; Round & Mazmanian, 2009). Het immuun systeem van de darm moet zich na de geboorte nog verder ontwikkelen. De ontwikkeling van de darm bacteriën begint tijdens het geboorteprocés en loopt door na het spenen (Frese et al., 2015). Deze darm bacteriën zijn van grote invloed op de ontwikkeling van het immuun systeem in de darm. Omdat de immuun competentie vorm krijgt in de eerste levensweken, kan deze bij (landbouwhuis)dieren worden verbeterd door matemale of neonatale nutritionele interventie.

Voerstrategieën op jonge leeftijd hebben meestal een langdurig effect op de immuun competentie, terwijl deze op latere leeftijd een meer tijdelijk effect hebben. Daarom is het belangrijk om de immuun ontwikkeling van biggen al vanaf een jonge leeftijd (pre- en postnataal) optimaal te ondersteunen middels voeding (van de zeug en zogende biggen).

Daarnaast zorgen veranderende omgevingsomstandigheden tijdens het spenen van biggen ervoor dat de immuun competentie van biggen meer onder druk komt te staan en het immuun systeem geactiveerd wordt. Zo ontstaan door de stress en de lage voeropname beschadigingen aan de darmwand, waardoor pathogenen gemakkelijker een infectie kunnen veroorzaken. Daarnaast is de voerovergang op spenen verantwoordelijk voor een grote verandering in de darm microbiota (Frese et al., 2015). Deze veranderingen vinden plaats terwijl er geen passieve immuniteit van de zeug meer is na het spenen, en de actieve immuniteit van de big zich nog volop aan het ontwikkelen is.

### *Reactie van het immuunsysteem op infecties en darmschade.*

In figuur 1 wordt weergegeven hoe het immuunsysteem reageert op bedreigingen voor het organisme (bijvoorbeeld infectieuze aandoeningen, weefselbeschadiging, ontsteking, toxines).



Figuur 1. Activatie van het immuunsysteem en responsparameters (Ametaj et al. 2010)

De belangrijkste regulator in het lichaam voor wat betreft ontstekingen is de zogenaamde transcriptie factor NF-κB (Pantano et al., 2006, Ametaj 2010). Deze NF-κB wordt bij herkenning van pathogene infecties en/of darmschade geactiveerd. Ook een overmaat aan oxidanten zorgt voor activatie van NF-κB. De activatie van NF-κB zorgt voor verhoging van de productie van specifieke signaal eiwitten, de cytokines. Er zijn zowel cytokines die de ontsteking stimuleren (pro-inflammatoire cytokines zoals IL-1, IL-6 en TNF-α) als cytokines die de ontsteking remmen (anti-inflammatoire cytokines zoals IL-4 en IL-10). In geval van darmschade en infecties komen de pro-inflammatoire cytokines vrij (Moya et al., 2006; Nordgreen et al., 2018). Door het vrijkomen van deze pro-inflammatoire cytokines, komen prostaglandinen vrij in de hypothalamus, het hersendeel dat de temperatuurregulatie verzorgt, en verandert het 'set-point' van de lichaamstemperatuur. Hierdoor treedt koorts op. De cytokines circuleren door het lichaam en met name de lever reageert hierop door acute fase-eiwitten (zoals haptoglobine) te maken (Carroll et al., 2005; Moya et al., 2006). Cytokines, acute fase-eiwitten en de lichaamstemperatuur worden daarom veelal gebruikt om de immuun competentie van biggen bij infecties in kaart te brengen.

#### Functie van vrije radicalen.

Tijdens cel metabolisme, inclusief immuunsysteemprocessen, worden vrije radicalen (ROS = Reactive Oxygen Species = oxidanten) geproduceerd. Vrije radicalen zijn zeer onstabiele verbindingen die leiden tot de vorming van reactieve peroxiden in de cellen. Vrije radicalen en peroxiden reageren met en beschadigen verschillende cel componenten, tenzij ze worden afgebroken tot minder reactieve verbindingen door zogenaamde antioxidanten.

Antioxidanten zijn stoffen die deelnemen aan chemische reacties die oxidatieve schade voorkomen. Oxidatieve stress wordt beschouwd als het resultaat van een onbalans tussen de productie van ROS en het vermogen van het lichaam om met antioxidanten ROS af te breken (Reuter et al., 2010; Pi et al., 2010). Als het anti-oxidatieve afweersysteem tekort schiet, wordt het immuunsysteem beperkt in zijn functie. Naast een verminderde immuniteit zorgt een onbalans met hoge ROS concentraties voor spierafbraak, verlies van eetlust, diarree, leverschade en uiteindelijk celdood, die de functie en overleving van het hele dier beïnvloeden (Yin et al., 2013).

In biggen komt oxidatieve stress met name voor na het spenen (Zhu et al., 2012). Oxidatieve stress houdt rechtstreeks verband met ontsteking vanwege het feit dat oxidanten NF-κB kunnen activeren. Ontsteking van de darm na het spenen gaat daarom ook gepaard met oxidatieve stress. Biggen zijn na het spenen

daarom extra gevoelig voor het oplopen van infectieuze ziektes. Om de negatieve effecten van deze veranderingen na het spenen (onbalans in darm-fysiologie, -microbiota, en -immunologie) zo goed mogelijk op te vangen, is het van belang om vóór en na het spenen het immuunsysteem van biggen optimaal te ondersteunen. Daarom wordt er gezocht naar 5.1 lid2h die een positieve bijdrage kunnen leveren aan de immuun competentie van biggen.

### Het bevorderen van de immuun competentie via voeding

Omdat het immuunsysteem van biggen nog volop in ontwikkeling is en het grootste gedeelte van de immuuncellen voorkomen in de darmwand, biedt dit de mogelijkheid om de immuun competentie van biggen te bevorderen door middel van 5.1 lid2h zoals bijvoorbeeld:

- *Voer(productie)strategieën:*
  - *Aminozuren:* Toevoeging van bepaalde aminozuren zoals arginine of aspartaat in het speenvoer kan zorgen voor bijvoorbeeld een verbeterde antioxidant status of verbeterde darm morfologie en barrièrefunctie (Bergeron et al., 2014; Pi et al., 2014).
  - *Vetzuren:* Bepaalde meervoudig onverzadigde vetzuren in het voer lijken de darmintegriteit van gespeende biggen te verbeteren (Liu et al., 2012).
  - *Mineraalbron:* Uit onderzoek op 5.1 lid2h is gebleken dat het gebruik van een organische selenium bron in het voer in plaats van een anorganische selenium bron een positief effect had op de immuun respons van gespeende biggen na immuun stimulatie, door de productie van anti-inflammatoire cytokines te stimuleren en oxidatieve stress te verminderen (5.1 lid2h, 5.1 lid2e).
- *Additieven, bijvoorbeeld:*
  - *Harszuren:* Harszuren uit naaldbomen hebben een anti-inflammatoire werking en als deze aan het voer van gespeende biggen toegevoegd worden dan hebben deze biggen een lagere concentratie van een darmontsteking biomarker en een veranderde cytokine productie dan biggen zonder harszuren in het voer (5.1 lid2h, 2020).
  - *Pre- en probiotica:* Er zijn indicaties dat pre- en probiotica de productie van pro- en anti-inflammatoire cytokines, en daarmee de immuun competentie van biggen, kan beïnvloeden (San Andres et al., 2019; Chen et al., 2020).

### Invloed van het voeren van de zeug en/of zogende biggen

De voeding van de zeug tijdens dracht, rondom werpen en tijdens lactatie, en de voeding van zogende biggen, kan ook invloed hebben op de immuuncompetentie van gespeende biggen. Zo hadden gespeende biggen waarvan de zeugen gist extract *Pichia guilliermondii* in het voer kregen tijdens dracht en lactatie meer antilichaam IgG in het bloed en een veranderde immuuncel populatie en immuunrespons dan gespeende biggen van controle zeugen. Bovendien waren de effecten op de immuunrespons sterker (additief effect) wanneer de biggen dit gist extract zelf ook in het voer na spenen kregen (Bass, 2012). Daarnaast produceerden bepaalde immuuncellen van zogende biggen die oraal gesupplementeerd werden met  $\beta$ -glucanen meer van anti-inflammatoire cytokine IL-10 dan biggen die geen  $\beta$ -glucanen binnenkregen (De Vries et al., 2020).

### Onderzoek

Binnen dit project worden strategieën getest die erop gericht zijn om de balans van het microbioom in maagdarm kanaal en / of luchtwegen en het immuunsysteem bij biggen te verbeteren.

Om strategieën en additieven op een effectieve en gecontroleerde wijze te testen heeft 5.1 lid2h drie verschillende diermodellen ontwikkeld /in gebruik. Binnen twee van deze modellen wordt gebruik gemaakt van goed gekarakteriseerde en milde stammen van de twee meest voorkomende bacteriën in de varkenshouderij. Binnen deze modellen is het doel om de kolonisatie van de bacteriën met voeding tegen te gaan. Met het derde model wordt direct het immuunsysteem geactiveerd en hiermee kan het effect van voeding op immuun competentie worden getest.

Uit onderzoek onder onze vorige projectvergunning is gebleken dat we met het E. coli kolonisatie model, het S. suis kolonisatie model en het LPS immuun competentie model goede resultaten kunnen boeken voor wat betreft het vinden van alternatieve voermaatregelen, welke vertaald kunnen worden naar de praktijk. Afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie en zijn werkingsmechanisme kunnen deze getest worden in één van onderstaande modellen, welke gericht zijn op een specifiek onderdeel van het immuunsysteem:



- E. coli kolonisatie model: Dit model wordt ingezet wanneer voeradditieven of voer(productie)strategieën gebruikt worden die een specifiek effect zouden hebben op E. coli infecties bij biggen. In het model worden gespeende biggen oraal geïnoculeerd met een milde stam van E. coli. De dieren ontwikkelen voor enkele dagen milde symptomen zoals dunne mest.

*De uitscheiding van E. coli en mestconsistentie zijn de belangrijkste uitleesparameters zijn.*

- S. suis kolonisatie model: Dit model wordt ingezet wanneer voeradditieven of voer(productie)strategieën gebruikt worden die een specifiek effect zouden hebben op de kolonisatie van S. suis bij biggen. In het model worden gespeende biggen oraal en nasaal geïnoculeerd met een milde stam van S. suis. De dieren kunnen tijdelijk lichte symptomen zoals een verhoogde lichaamstemperatuur vertonen.

*De kolonisatie van S. suis op de tonsillen en de uitscheiding in de darmen zijn de belangrijkste uitleesparameters.*

- LPS immuun competentie model: Het best gekarakteriseerde model voor immuun activatie en oxidatieve stress in biggen is de lipopolysaccharide (LPS) geïnduceerde immuun activatie, welke in deze aanvraag 'LPS immuun activatie model' genoemd zal worden. LPS is een bestanddeel van bacteriewanden, welke (binnen enkele uren) een acute ontstekingsreactie kan veroorzaken (zie Figuur 1). De ontstekingsreactie na LPS injectie activeert onder andere enzymen die vrije radicalen vormen, waardoor er oxidatieve cel schade ontstaat (Kadiska et al., 2015). LPS is daarom ook een goed model voor oxidatieve stress in biggen (Hou et al., 2014).

*Parameters passend bij oxidatieve stress en reactie van de lever, zoals acute fase eiwitten, cytokines en lever enzymen zijn de belangrijkste uitleesparameters.*

## Referenties

- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. EFSA Journal 2014;12(5):3668, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3668
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2016. Scientific opinion on the revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. EFSA Journal 2016;14(8):4563, 100 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4563
- Europese Commissie. 2016. Uitvoeringsverordening (EU) 2016/1095 tot verlening van een vergunning voor zinkacetaat-dihydraat, watervrij zinkchloride, zinkoxide, zinksulfaat-heptahydraat, zinksulfaat-monohydraat, zinkchelaat van aminozuren, gehydrateerd, zinkchelaat van eiwithydrolysaten, zinkchelaat van glycinehydraat (vast) en zinkchelaat van glycinehydraat (vloeibaar) als toevoegingsmiddelen voor diervoeding voor alle diersoorten en tot wijziging van Verordeningen (EG) nr. 1334/2003, (EG) nr 79/2006, (EU) nr. 335/2010 en Uitvoeringsverordeningen (EU) nr. 991/2012 en (EU) nr. 636/2013. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R1095&from=EN>
- Europese Commissie. 2018. Uitvoeringsverordening (EU) 2018/1039 tot verlening van een vergunning voor koper(II)diacetaat-monohydraat, koper(II)carbonaathydroxide-monohydraat, koper(II)chloride-dihydraat, koper(II)oxide, koper(II)sulfaat-pentahydraat, koper(II)chelaat van aminozuren, gehydrateerd, koper(II)chelaat van eiwithydrolysaten, koper(II) chelaat van glycine, gehydrateerd (vast), en koper(II)chelaat van glycine, gehydrateerd (vloeibaar), als toevoegingsmiddelen voor diervoeding voor alle diersoorten en tot wijziging van de Verordeningen (EG) nr. 1334/2003, (EG) nr. 479/2006 en (EU) nr. 349/2010 en de Uitvoeringsverordeningen (EU) nr. 269/2012, (EU) nr. 1230/2014 en (EU) 2016/2261. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1039&from=NL>
- Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij 2023. 2013 [5.1 lid2h](#), [5.1 lid2e](#)
- GD Deventer, 2018. Monitoring diergezondheid varkens: rapportage eerste halfjaar 2018. Online Monitor: stand van zaken 2018. p19-21.
- Ametaj B.M. et al. Review of Acute Phase Proteins for monitoring inflammatory states in cattle. ISBN:978-953-307-873-1. InTech. <http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-as-early-non-specific-biomarkers-of-human-and-veterinary-diseases/application-of-acute-phase-proteins-for-monitoring-inflammatory-states-in-cattle>.
- Dou S, Gadonna-Widehem P, Rome V, Hamoudi D, Rhazi L, Lakhil L, et al. (2017) Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. PLoS ONE 12(1): e0169851.
- Strangmann E, Froleke H, Kohse KP. 2002. Septic shock caused by Streptococcus suis: case report and investigation of a risk group, Int J Hyg Environ Health 205: 385-92.
- Elbers AR, Vecht U, Osterhaus AD, et al. 1999. Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents Brucella abortus, Leptospira spp., Streptococcus suis serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands, Vet Q 21: 50-4.
- Trung, H.D., N, Le Thi Phuong T, Wolbers M, Nguyen Van Minh H, Nguyen Thanh V, Van MP, et al. 2012. Aetiologies of Central Nervous System Infection in Viet Nam: A Prospective Provincial Hospital-Based Descriptive Surveillance Study. Plos One. 7(5):e37825.
- Van der Peet-Schwering C.M.C., Binnendijk G.P, Kuijken N., Raymakers R. (2008). Beheersing van Streptococcus suis bij gespeende biggen door managementmaatregelen. Animal Sciences Group Wageningen UR. Rapport 119
- Europese Commissie. 2016. Special Eurobarometer 442 – Attitudes of Europeans towards animal welfare. <https://ec.europa.eu/commfrontoffice/downloadODP/?B5163B36F9C7BD6AA12FF2DBD4E1DF19>
- SDa, autoriteit diergezondheidsmiddelen. 2020. Rapport 'Het gebruik van antibiotica bij landbouwhuisdieren in 2019.' [https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergezondheidsmiddelen/userfiles/sda%20jaarrapporten%20ab-gebruik/ab-rapport-2019/sda-rapport-het-gebruik-van-antibiotica-bij-lhd-in-2019-\(1\).pdf](https://cdn.i-pulse.nl/autoriteitdiergezondheidsmiddelen/userfiles/sda%20jaarrapporten%20ab-gebruik/ab-rapport-2019/sda-rapport-het-gebruik-van-antibiotica-bij-lhd-in-2019-(1).pdf)



- GD Deventer, 2017. Rapport van het project 'Bedrijfskenmerken, bedrijfsinrichting, diergezondheid en factoren in kennis – houding – gedrag op zeugen- en vleesvarkensbedrijven met een laag versus een hoog antibioticumgebruik'. <https://edepot.wur.nl/430324>
- KNMvD, 2017. Richtlijn Streptococcus suis bij gespeende biggen. <https://www.knmvd.nl/app/uploads/2018/07/RICHTLIJN-STREPTOCOCCUS-SUIS-DEF-APRIL-2014.pdf>
- Guavarra, R.B., Lee, J.H., Lee, S.H., Seok, M.J., Kim, D.W., Kang, B.N. et al. 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2019) 10:1.
- Virdi, V., Palaci Bataller, J., Laukens, B., Ryckaert, S., Cox, E., Vanderbeke, E., Depicker, A., Callewaert, N. 2019. Yeast-secreted, dried and food-admixed monomeric IgA prevents gastrointestinal infection in a piglet model. *Nature Biotechnology* 37(5), 527–530.
- Virdi, V., Coddens, A., De Buck, S., Millet, S. et al. 2013. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Proc Natl Acad Sci* 110(29):11809-14.
- Dubreuil, J.D. 2017. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know?. *Biosci Microbiota Food Health*. 36(3):75-90. doi:10.12938/bmfh.16-030
- Wang, J., Zeng Y., Wang S., Liu, H., Zhang, D., Zhang, W., Wang, Y., Ji, H. 2018. Swine-Derived Probiotic *Lactobacillus plantarum* Inhibits Growth and Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Mediates Host Defense. *Front. Microbiol.* 9.
- Zhang W, Zhu Y-H, Zhou D, Wu Q, Song D, Dicksved J, Wang J-F. 2017. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function following *Escherichia coli* challenge in newly weaned pigs of genotype MUC4 that are supposed to be enterotoxigenic *E. coli* F4ab/ac receptor negative. *Appl Environ Microbiol* 83:e02747-16
- Jiménez, M.J., Berrios, R., Stelzhammer, S., Hohmann, M., Verri Jr. W. et al. 2020. Ingestion of organic acids and cinnamaldehyde improves tissue homeostasis of piglets exposed to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Journal of Animal Science*:1-11.
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., & Mills, D. A. 2015. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0091-8>
- Suiryanrayna, M.V., Ramana, J.A. 2015. Review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J Animal Sci Biotechnol* 6, 45.
- Tsiloyiannis VK, Kyriakis SC, Vlemmas J, Sarris K. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res Vet Sci.* 70(3):287-93.
- 5.1 lid2h, 5.1 lid2 van Oostrum M, Pérez JF, Mateos GG, Nyachoti CM, van der Aar PJ. 2014. Relevance of functional properties of dietary fibre in diets for weaning pigs. *Anim Feed Sci Technol.* 189:1-10.
- Bass, Benjamin Edward. 2012. Influence of Nutritional Modifications on Sow, Litter, and Nursery Performance. Theses and Dissertations.
- De Vries, H., M. Geervliet, C.A. Jansen, V.P.M.G. Rutten, H. van Hees, N. Groothuis et al. 2020. Impact of Yeast-Derived  $\beta$ -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. *Microorganisms* 8, 1573
- Amass, S.F., Clark, L.K., Knox, K., Wu, C.C., Hill, M.A. *Streptococcus suis* colonization of piglets during parturition. *Swine Health Prod.* 1996;4:269-272.
- Dekker, N., Bouma, A., Daemen, I., Klinkenberg, D., van Leengoed, L., Wagenaar, J.A. et al. 2013. Effect of Spatial Separation of Pigs on Spread of *Streptococcus suis* Serotype 9. *PLoS ONE* 8(4): e61339.
- Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci* 34:31-67.
- Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *J Anim Sci Biotechnol.* 2020;11:44.
- Dierick N, Decuyper J, Molly K, Van Beek E, Vanderbeke E. 2002. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. *In vitro* screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livest Prod Sci.* 75:129-142.
- Trevisi P, Colombo M, Priori D, Fontanesi L, Galimberti G, Calò G, Motta V, Latorre R, Fanelli F, Mezzullo M, Pagotto U, Gherpelli Y, D'Inca R, Bosi P. 2015. Comparison of three patterns of feed supplementation with live *Saccharomyces cerevisiae* yeast on postweaning diarrhea, health status, and blood metabolic profile of susceptible weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4ac. *J Anim Sci.* 93(5):2225-33.
- Trevisi, P., Latorre, R., Priori, D., Luise, D., Archetti, I., Mazzoni, M., D'Inca, R., Bosi, P. 2017. Effect of feed supplementation with live yeast on the intestinal transcriptome profile of weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4. *Animal*, 11(1), 33-44.
- Cheng, C., Hongkui Wei, Chuanhui Xu, Xiaowei Xie, Siwen Jiang, Jian Peng. 2018. Maternal Soluble Fiber Diet during Pregnancy Changes the Intestinal Microbiota, Improves Growth Performance, and Reduces Intestinal Permeability in Piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (17) e01047-18
- Feyera T, Højgaard CK, Vinther J, Bruun TS, Theil PK. Dietary supplement rich in fiber fed to late gestating sows during transition reduces rate of stillborn piglets. *J Anim Sci.* 2017 Dec;95(12):5430-5438.
- Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci.* 90(8):2581-9.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology & medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME. 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):77-83.
- 5.1 lid2h
- Ferrando ML, van Baarlen P, Orrù G, et al. 2014. Carbohydrate availability regulates virulence gene expression in *Streptococcus suis*. *PLoS One.* 2014;9(3):e89334.
- Furness JB, Kunze WA, Clerc N. 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol.* 277(5):G922-8.
- Vighi, G., Marcucci, F., Sensi, L., Di Cara, G., & Frati, F. 2008. Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and experimental immunology* 153, Suppl 1, 3-6.
- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. 2010. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med.* 16(2):228-31.
- Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y. 2008. Commensal DNA Limits Regulatory T Cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses. *Immunity* 29(4): 637-649.
- Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C. 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis.* 48(5):617-25. PMID: 19191650.
- Smith K., McCoy K. D., Macpherson A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59-69
- Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(5):313-23.

- San Andres, J.V., Gabriel A Mastromano, Yanshuo Li, Huyen Tran, Justin W Bundy, Phillip S Miller, Thomas E Burkey. 2019. The effects of prebiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs, *Translational Animal Science* 3:1315–1325.
- Chen, F., Houjun Wang, Jiayi Chen, Yang Liu, Wei Wen, Yinghui Li, Xingguo Huang. 2020. *Lactobacillus delbrueckii* Ameliorates Intestinal Integrity and Antioxidant Ability in Weaned Piglets after a Lipopolysaccharide Challenge. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 6028606, 10 pages.
- Bergeron, N., Robert, C., Guay, F. 2014. Feed supplementation with arginine and zinc on antioxidant status and inflammatory response in challenged weanling piglets. *Animal Nutrition* 3(3):236-246.
- Pi D, Liu Y, Shi H, Li S, Odle J, Lin X, et al. 2014. Dietary supplementation of aspartate enhances intestinal integrity and energy status in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge. *J Nutr Biochem*. 25:456–62.
- Pantano C., Reynaert N. L., van der Vliet A., and Janssen-Heininger Y. M.. 2006. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal*. 8:1791–1806.
- Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S.K. 2012. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *J Nutr* 142(11):2017-24.
- Waititu, S.M., J.M. Heo, R. Patterson, C.M. Nyachoti. 2016. Dietary yeast-based nucleotides as an alternative to in-feed antibiotics in promoting growth performance and nutrient utilization in weaned pigs. *Can J Anim Sci*, 96:3.
- Wu, C., Xu, Q., Wang, R., Qing, L., Peng, X., Hu., L., Liu, Y. et al. 2018. Effects of dietary  $\beta$ -glucan supplementation on growth performance and immunological and metabolic parameters of weaned pigs administered with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Food Funct*. 9, 3338–3343.
- Moya, S.L., Boyle, L., Lynch, P.B., and Arkins, S. 2006. Pro-inflammatory cytokine and acute phase protein responses to low-dose lipopolysaccharide (LPS) challenge in pigs. *Animal Science* 82: 527–534
- Nordgreen, J., Munsterhjelm, C., Aae, F., Popova, A., Boysen, P. et al. 2018. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on inflammatory markers in blood and brain and on behavior in individually-housed pigs. *Physiology & Behavior* 195:98-111.
- Carroll, J.A., Carter, D.B., Korte, S.W., Prather, R.S. 2005. Evaluation of the acute phase response in cloned pigs following a lipopolysaccharide challenge. *Domest Anim Endocrinol* 29(3):564-72.
- Williams et al, 2009. Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 37(3):139-147.
- Terenina, E., Valérie Sautron, Caroline Ydier, Darya Bazovkina, Amélie Sevin-Pujol, et al. 2017. Time course study of the response to LPS targeting the pig immune gene networks. *BMC Genomics, BioMed Central* 18, ff10.1186/s12864-017-4363-5ff.
- Kadiiska MB, Peddada S, Herbert RA, et al. 2015. Biomarkers of oxidative stress study VI. Endogenous plasma antioxidants fail as useful biomarkers of endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 81:100-106.
- Hou X, Zhang J, Ahmad H, Zhang H, Xu Z, et al. (2014) Evaluation of Antioxidant Activities of Ampelopsin and Its Protective Effect in Lipopolysaccharide Induced Oxidative Stress Piglets. *PLoS ONE* 9(9): e108314.
- Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. 2017. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 3(4):313-321.
- AgroVision, 2020. *Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari-december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.*
- Knecht D, Cholewińska P, Jankowska-Mąkosa A, Czyż K. 2020. Development of Swine's Digestive Tract Microbiota and Its Relation to Production Indices-A Review. *Animals (Basel)*10(3):527.
- Buchet A, Belloc C, Leblanc-Maridor M, Merlot E. 2017. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PLoS ONE* 12(5): e0178487.
- Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., Klünter, A. 2019. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250: 9-31.
- Lallès J-P and Fagerhol MK 2005. Faecal calprotectin: a non-invasive marker of inflammation in pigs? *ISAH* 1, 405–408.
- Lemoine N., Fautrel A., Técher M., Guillou D., 2018. Validation of a quantitative biomarker of gut inflammation in weaned piglets. 14th International Symp. Digest. Physiol. Pigs, Brisbane, Australia.
- Rubio, C.P., Mainau, E., Cerón, J.J. et al. 2019. Biomarkers of oxidative stress in saliva in pigs: analytical validation and changes in lactation. *BMC Vet Res* 15, 144.

## 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

### Doelstelling

De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen. Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en *E. coli* en *S. suis* infecties te verminderen.

Uiteindelijk doel:

Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale [5.1 lid2h](#). Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu vermindert.

Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Hieronder vallen drie subdoelen:

het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:

- het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen
- het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen
- de immuun competentie van gespeende biggen

### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De doelstellingen zijn realistisch en haalbaar, omdat:

- alle expertise die nodig is beschikbaar is op 5.1 lid2h . 5.1 lid2h waar de proeven worden uitgevoerd is een onafhankelijk 5.1 lid2h voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvragen te beantwoorden. Beschikbare expertises zijn kennis van fysiologie, (darm)gezondheid, microbiologie, grondstoffen, voederwaardering, nutritionele behoeften en gedrag. Het personeel is deskundig en de onderzoekers in dienst hebben een Ir-, MSc-, DVM- of PhD-titel. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan de projecten, waardoor voortgang en kwaliteit van het project is gewaarborgd.
- samengewerkt wordt met nationale en internationale onderzoeksinstellingen in projecten waarbij zowel universiteiten als private bedrijven betrokken zijn zodat geavanceerde technieken op efficiënte wijze gebruikt kunnen worden. Deze kennis is vervolgens beschikbaar voor de klanten (5.1 lid2h 5.1 lid2h bedient meer dan 95% van de Nederlandse 5.1 lid2h op inhoudelijke kennis op grondstoffen gebied en voorlichting. Op deze manier draagt 5.1 lid2h bij aan de ambitie 'kennis, leervermogen en innovatie' ter verduurzaming van de Nederlandse veehouderij (Uitvoeringsagenda Duurzame Veehouderij, 2013). Op wereldwijd niveau bedient 5.1 lid2h op moment van schrijven 10% van de 5.1 lid2h Dit betekent dat de (hier) gegenereerde kennis er voor zorgt dat de gezondheids- en welzijnsstandaard in grote stappen naar een hoger niveau kan worden gebracht via het netwerk, wat ook belangrijk is voor verduurzaming van de Nederlandse veehouderij.
- de doelstelling is gebaseerd op voorgaand onderzoek in varkens door 5.1 lid2h en anderen (review over E. coli en LPS modellen: Adewole et al., 2016).
- 5.1 lid2h veel ervaring heeft opgebouwd met het uitvoeren van dit type onderzoeksprojecten. Dit is namelijk een vervolgpjectaanvraag, als vervolg van vergunning AVD5.1 lid2h . Qua ziekteverschijnselen onderscheiden de 'kolonisatie' modellen van 5.1 lid2h zich van E. coli en S. suis 'infectie' modellen in de literatuur voor wat betreft de mortaliteit ten gevolge van de inoculatie (o.a. Becker et al., 2020; Pallarés et al., 2003) welke we hebben kunnen reduceren met behoud van een goed resultaat voor wat betreft effectiviteit van het model. De modellen zijn de afgelopen jaren doorontwikkeld, waarbij er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie wordt gevonden (E. coli en S. suis kolonisatie model) of een duidelijke immuunrespons (LPS immuun competentie model) met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen en ongerief (Luise et al., 2019).

Voorbeelden van opbrengsten uit de vorige projectvergunning:

- Door-ontwikkeling van de modellen, waaronder:
  - In het huidige model worden de S. suis bacteriën zowel oraal als nasaal geïnoculeerd, omdat tijdens onderzoek binnen de voorgaande projectvergunning is gebleken dat inoculatie via enkel de orale route onvoldoende is om de gewenste besmettingsgraad te bereiken.
  - Om de (her)haalbaarheid van de proef te verhogen zijn verschillende stressoren voorafgaand S. suis inoculatie getest. Hierbij kwam het verplaatsen (naar een andere stal binnen 5.1 lid2h ) en mixen van dieren als stressor het beste naar voren en is daarbij onderdeel van het model geworden.
  - Het mest consistentie protocol in het E. coli kolonisatie model is objectiever gemaakt door het droge stof gehalte van mestmonsters te bepalen.
  - Ook zijn er door samenwerking met externe labs en innovatie binnen 5.1 lid2h nieuwe biomarkers getest om het werkingsmechanisme van de voerstrategieën zo goed mogelijk in kaart te kunnen brengen.

- Effectieve voerstrategieën voor gespeende biggen om E. coli en S. suis te verminderen en de immuun competentie van biggen te verhogen. Naast de gegeven voorbeelden onder 3.1. zijn enkele andere voorbeelden van voerstrategieën die met succes getest zijn:
  - Een mengsel van korte keten en middelketen lange vetzuren in vrije vorm in het voer was in staat om S. suis kolonisatie te verminderen. Middelketen lange vetzuren worden in vrije vorm toegevoegd aan het voer, omdat dit effectiever bleek dan het toevoegen van middelketen lange triglyceriden in een olie.
  - Het toevoegen van een levende gist aan het voer verbeterde de mestscore en verminderde de E. coli concentraties in de darm en in de mest.
  - Gesproeidroogd varkensplasma als alternatieve eiwitbron in plaats van magere melkpoeder verhoogde de voeropname en groei, verbeterde de mestscore en verminderde de kolonisatie van E. coli in de biggen.
- Nieuwe inzichten m.b.t. de invloed van voeding en management van de zeug en zogende biggen door kennis verworven uit projecten met partner-5.1 lid2h Om deze reden worden ook de zeugen benoemd in dit project en in de uitvoering van het onderzoek.

### Referenties

- Adewole DI, Kim IH, Nyachoti CM. Gut Health of Pigs: Challenge Models and Response Criteria with a Critical Analysis of the Effectiveness of Selected Feed Additives - A Review. Asian-Australas J Anim Sci. 2016;29(7):909-924.
- Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., Trevesi, P. 2019 Methodology and application of Escherichia coli F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. Journal of Animal Science and Biotechnology (2019) 10:53.
- Becker, S.L., Li, Q., Burrough, E.R., Kenne, D., Sahin, O., Gould, S.A., and Patience, J.R. 2020. Effects of an F18 enterotoxigenic Escherichia coli challenge on growth performance, immunological status, and gastrointestinal structure of weaned pigs and the potential protective effect of direct-fed microbial blends. Journal of Animal Science 98: 1–10
- Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Schmitt, C.S., Roth, J.A., Opriessnig, T. et al. 2003. Comparison of experimental models for St reptococcus suis infection of conventional pigs. The Canadian Journal of Veterinary Research 67: 225-228.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

### 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

#### Wetenschappelijk belang

Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbioom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.

#### Maatschappelijk belang

E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

- Zeugen en biggen

Met behulp van effectieve voerstrategieën en voeradditieven bij zeugen en biggen kan de gezondheid en het welzijn van jonge biggen verbeterd worden. Wanneer voerconcepten bij de zeugen getest worden, wordt er geen of een positief effect verwacht omtrent de gezondheid en het welzijn van de zeugen.

- 5.1 lid2h

Het belang van 5.1 lid2h is dat zij hun voerstrategieën en voerconcepten kunnen verbeteren zodat zij hun klanten, de varkenshouders, beter kunnen adviseren met betrekking tot gezondheid en welzijn van hun biggen en daarmee een vermindering van ziekte en antibioticumgebruik.

- Consument

Preventie van infectieuze aandoeningen en verbetering van de werking van het immuunsysteem zal leiden tot een verminderd antibioticumgebruik, minder resistentievorming voor antibiotica en minder besmettingen van mensen met S. suis en daardoor minder risico's voor de volksgezondheid.

- Varkenshouders

Varkenshouders kunnen hun beroep met de meeste voldoening en de beste kosten-efficiëntie uitoefenen indien zij voorzien worden van actuele kennis met betrekking tot voeding en gezondheid van hun dieren. Daarbij dienen zij de gezondheid van hun dieren te waarborgen binnen de milieu-wetgeving. Het sparen van het milieu en het waarborgen van de gezondheid van hun dieren staan regelmatig op gespannen voet, daarom is praktijkgericht onderzoek en advies m.b.t. dit onderwerp van groot belang. Daarnaast zijn veehouders in nauw contact met hun dieren en aangezien S. suis een ziekte is waarvoor zij gevoelig zijn hebben zij er belang bij dat ziekte door deze bacterie wordt voorkomen.

- Leveranciers van (voer)additieven

Het belang van leveranciers van voeradditieven is dat zij de effectiviteit van hun producten kunnen aantonen voor wat betreft preventie van bacteriële aandoeningen en werking van het immuunsysteem.

- Milieu

De milieuwetgeving wordt voor de varkenshouderij strenger. Het verminderen van het gebruik van hoge doseringen aan koper en zink is ongewenst en slecht voor het milieu. Indien de gezondheid van varkens verbeterd kan worden zonder grote hoeveelheden van deze mineralen te voeren is dit winst voor het milieu.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Het doel van het project is het optimaal ondersteunen van de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen ziektes. De strategie begint met het uitgebreid verzamelen van informatie over de achtergrond en het werkingsmechanisme van het voeradditief. Deze informatie wordt gezocht in de literatuur, gebaseerd op kennis en ervaring binnen 5.1 lid2h, en gebaseerd op informatie, zoals onderzoek, van de toeleverancier. Het doel van deze zogenaamde 'voorstudie' is om duplicatie te voorkomen en antwoorden te vinden op de vragen van het selectieproces, zie hieronder. Dit selectieproces waarborgt dat alleen relevante voedingsinterventies ingezet worden in het onderzoek onder dit project.

Voorafgaand aan iedere proef binnen dit project worden de volgende vragen gesteld om te bepalen of de proef uitgevoerd zal worden:

- Omvat de proef het testen van een voeradditief of voer(productie)strategie?
- In het geval van het testen van een voeradditief, is het additief *in vitro* of voor andere doelstellingen of bij andere diersoorten getest met positief resultaat?
- Kan de kennis die met de aanvraag wordt verkregen op Nederlands en Europees niveau worden toegepast?

Als op 1 of meerdere van bovenstaande vragen 'nee' geantwoord wordt, zal de proef niet plaatsvinden.

Als op alle bovenstaande vragen 'ja' geantwoord is zullen de volgende vragen gesteld worden om tot de beste proefopzet te komen:

- Wat is de achtergrond van het voeradditief of de voer(productie)strategie?
- Wat is het werkingsmechanisme van het voeradditief of de voer(productie)strategie; is het gericht op E. coli, óf S. suis óf het moduleren van het immuunsysteem?
- Zijn er aanvullende monsters nodig om de onderzoeksvraag te beantwoorden? Zo ja, welk type en welke frequentie van bemonstering is nodig?
- In het geval van een voeradditief, hoe dient het additief verwerkt te worden (bijv. gepelleerd voer, ongepelleerd voer, drinkwater) en in welke dosering(en)?



In varkensvoerders worden regelmatig meerdere additieven tegelijkertijd gebruikt. De werking van additieven hoeft niet altijd elkaar versterkend te zijn; zo kunnen producten een overlappend werkingsmechanisme hebben, of een tegenstrijdig effect (bijvoorbeeld een combinatie van organische zuren en probiotica). Daarom kunnen in proeven binnen dit project combinaties van voeradditieven binnen één behandeling worden getest om dit effect te onderzoeken.

In het geval van voerstrategieën in het voer van zogende biggen zal er een go-no go beslissing plaatsvinden op spenen. Hierbij is het namelijk van belang dat biggen het voer vóór het spenen hebben gegeten om effecten van de voerstrategie te zien. Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.

Binnen dit project worden drie modellen gebruikt die een verschillend onderdeel van de gezondheid belichten. De strategieën zullen in één van deze modellen worden getest, omdat deze specifiek op een onderdeel van de gezondheid werken en het dus niet zinnig is om het product in meerdere modellen te testen. Het effect van voerstrategieën en voeradditieven op de kolonisatie van E. coli zal worden bestudeerd in het E. coli kolonisatie model (**Bijlage 1**), waar het effect op de kolonisatie van S. suis bestudeerd zal worden in het S. suis kolonisatie model (**Bijlage 2**). Wanneer het product geen specifieke werking heeft tegen E. coli of S. suis, maar (de ontwikkeling van) het immuunsysteem kan beïnvloeden, wordt het LPS immuun competentie model ingezet (**Bijlage 3**).

Om de doelstelling van dit project te behalen voert **5.1 lid2h** toegepast onderzoek uit, zowel collectief onderzoek (op thema basis) als individueel contractonderzoek.

Het collectief onderzoek. Onderzoek dat uitgevoerd wordt voor collectieven van **5.1 lid2h** hebben veelal als doel voerconcepten te ontwikkelen, waarin voeradditieven en voer(productie)strategieën op de meeste effectieve wijze kunnen worden ingezet om de darmgezondheid en weerbaarheid van biggen tegen ziektes optimaal te ondersteunen. De opzet en uitvoering van het onderzoek wordt vastgesteld door onderzoekers gezamenlijk met een wetenschappelijk team, consultants en een afvaardiging (nutritionisten en R&D) uit het collectief van **5.1 lid2h** om de relevantie en toepasbaarheid voor de praktijk te garanderen. Onderzoeksresultaten worden besproken met deze zelfde afvaardiging en vervolgens breed gedeeld aan alle **5.1 lid2h** in het collectief (zie **Figuur 2**). Er wordt ook samengewerkt met verschillende (internationale) onderzoeksinstituten. Op het moment van schrijven wordt er in een EU-project met 13 partners uit 9 Europese landen samengewerkt aan nieuwe voerstrategieën en voeradditieven als alternatief voor het gebruik van antimicrobiële middelen, specifiek tegen speendiarree door E. coli. Ook werkt **5.1 lid2h** op het moment van schrijven samen met 7 partners in een **5.1 lid2h** om S. suis infecties bij biggen te verminderen.

**Figuur 2.** Diverse stadia van het collectief onderzoek. Onder onderzoekers worden de onderzoekers van **5.1 lid2h** verstaan.



Het contractonderzoek bestaat voornamelijk uit onderzoek naar de effectiviteit van voeradditieven en voer(productie)strategieën in biggen. Dit betreft producten die ontwikkeld worden door toeleveranciers van de 5.1 lid2h of specifieke vragen van hen over het effect van bepaalde factoren (bijv. voerproductie). Samen met de R&D-afdeling van de opdrachtgever wordt door de onderzoekers een proefopzet vastgesteld.

### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Het onderzoek dat wordt uitgevoerd voor een collectief van 5.1 lid2h is onderzoek dat gewenst en nuttig is voor nationale en internationale 5.1 lid2h. Omdat onderzoeken voor deze vaste klanten als basis kunnen dienen voor vervolgonderzoek, wordt de verkregen kennis optimaal benut. 5.1 lid2h bedient meer dan 5.1 lid2h op inhoudelijke kennis op grondstoffen gebied en voorlichting. Op wereldwijd niveau bedient 5.1 lid2h op moment van schrijven 5.1 lid2h. Dit betekent dat de (hier) gegenereerde kennis er voor zorgt dat de gezondheids- en welzijnsstandaard in grote stappen naar een hoger niveau kan worden gebracht via het netwerk. De 5.1 lid2h zijn tevens de belangrijkste adviseurs op voergebied van de veehouders. Daarom heeft dit onderzoek veel invloed op de kennis en toegepaste strategie van veehouders met betrekking tot het voeren van varkens zodat deze dieren gezond blijven en het gebruik van antibiotica en mineralen kan worden gereduceerd waardoor het milieu niet teveel belast wordt. 5.1 lid2h werkt daarnaast nauw samen met kennis- en onderzoeksinstituten binnen Nederland en daarbuiten die kennis genereren en ontwikkelingen monitoren op het gebied van bijvoorbeeld de gezondheid van dieren en diagnostische technieken. Hierdoor kunnen resultaten en waarnemingen zeer efficiënt worden gebruikt om de doelstellingen te bereiken.

Het contractonderzoek wordt uitgevoerd voor klanten die veelbelovende (voer)additieven willen onderwerpen aan onderzoek zodat deze producten op de markt kunnen worden ingezet. Door via literatuuronderzoek en / of eerder onderzoek een goede voorbereidende studie te doen naar werkingsmechanismes van de additieven wordt het onderzoek zo effectief mogelijk opgezet. Het onderzoek wordt daarom wel als op zichzelf staand onderzoek uitgevoerd, maar reeds bekende resultaten uit eerder onderzoek bij een zelfde type product worden zo zorgvuldig mogelijk meegenomen bij het opzetten van het onderzoek.

### 3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen
2	Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen
3	Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

Volgnummer	Titel dierproef
1	Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.



## Inleiding

Escherichia coli (E. coli) infectie is de meest gestelde diagnose voor maagdarmaandoeningen bij varkens. Zoals omschreven in het projectvoorstel, zijn biggen extra gevoelig voor E. coli infecties na het spenen, omdat de darm microbiota dan uit balans raakt en de darmintegriteit afneemt, waardoor E. coli makkelijker kan koloniseren. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en vaccins die ingezet worden in de praktijk.

Omdat uit onderzoek van 5.1 lid2h en de literatuur is gebleken dat biggen met speendiarree al kunnen verschillen in hun darm microbiota vóór het spenen, worden de voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage niet alleen toegepast in het voer voor gespeende biggen, maar kunnen deze ook verstrekt worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen.

In deze laatste gevallen kunnen de langere termijn effecten van deze strategieën op speendiarree onderzocht worden. In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op het verloop van E. coli kolonisatie. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden. Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën worden ontwikkeld voor de praktijk om zo de (darm)gezondheid, en daarmee het welzijn, van varkens te verbeteren (minder diarree en sterfte), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica en zink te verminderen.

## Experimentele aanpak

Bij het veroorzaken van ziekte spelen aanhechtingsfactoren (zoals bijv. F4) en specifieke toxines, zoals hitte labiel/stabiel toxine, een belangrijke rol. De E. coli stammen op 5.1 lid2h zijn gekarakteriseerd op deze kenmerken, zodat het onderzoek uitgevoerd wordt met een voor de praktijk relevante E. coli stam. De afgelopen jaren is uit onderzoek op 5.1 lid2h gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen de darm kolonisatie van biggen in de kraamstal beïnvloed kan worden, welke vervolgens een grote rol spelen in gezondheid van biggen na spenen. Naast voeding van zeug en biggen voor spenen, speelt ook de (abrupte) voerovergang op het moment van spenen een rol in het risico op E. coli kolonisatie na het spenen, waardoor het belangrijk kan zijn onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom wordt onderzoek gedaan met proefopzetten waarin de voeding van de zeug, de zogende big en/of de gespeende big een rol kan spelen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethoden

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)		
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gepeende biggen		Inoculatie E. coli gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van inoculatie	Gebruik antibioticum <sup>c</sup>
1	Ja				Ja	Dag 4	Nee
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4	Nee
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4	Nee
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-14	Nee
5			Ja		Ja	Dag 4-14	Ja

<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in de kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van inoculatie is afhankelijk van de lengte van de proefvoeradaptatieperiode van het testproduct

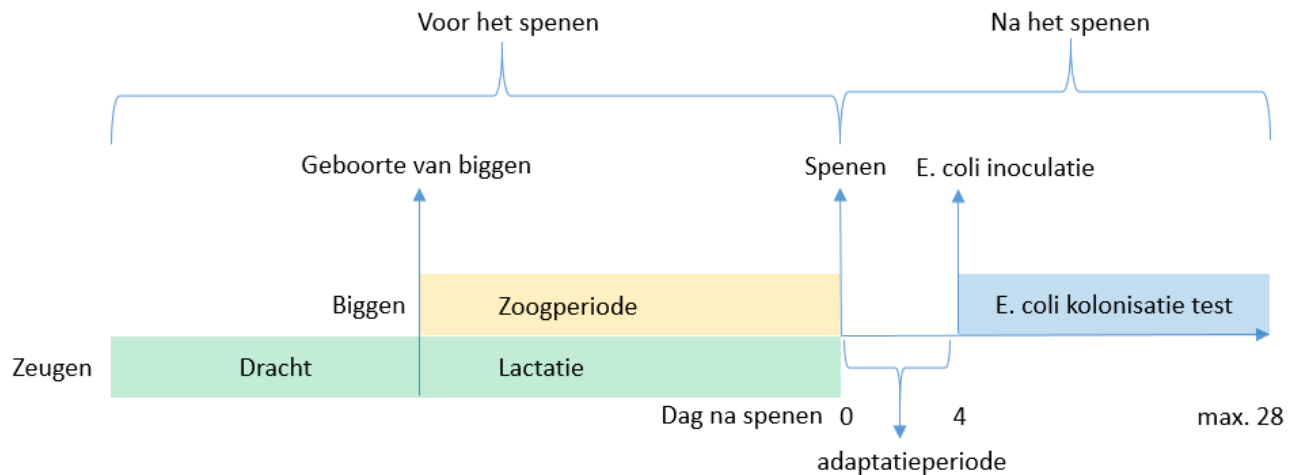
<sup>c</sup> Antibioticum behandeling t.b.v. standaardisatie E. coli in het maagdarmkanaal van de biggen

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op E. coli kolonisatie na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te inoculeren na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab wordt bepaald of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen. Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnoculeerd worden met E. coli op dag 4 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnoculeerd kunnen worden met E. coli. Het moment van inoculeren is dus flexibel, maar wel altijd tussen 4 en 14 dagen na het spenen.

**Ad c.** Bij methode 5 wordt uitsluitend naar het effect van de proefbehandeling bij gespeende biggen gekeken. Daarom worden de biggen voor wat betreft aanwezigheid van *E. coli* in het maagarmkanaal zoveel mogelijk gestandaardiseerd met behulp van een antibioticumkuur om mogelijke zeugen effecten te verminderen.

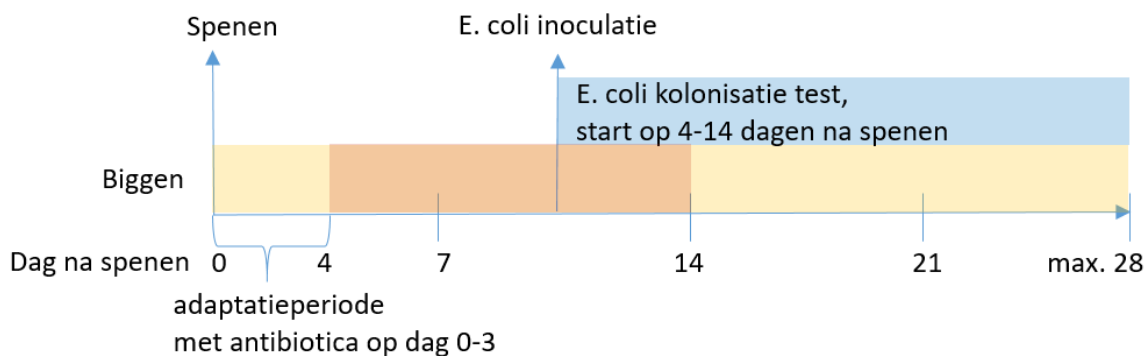
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnoculeerd met *E. coli*.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen, worden behandeld met een smalspectrum antibioticum. De gespeende biggen worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van deze proefvoerperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waarna de biggen geïnoculeerd worden met *E. coli*. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de *E. coli* inoculatie kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

## **Algemeen**

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waardoor de E. coli kolonisatie test zal starten op 4-14 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de E. coli kolonisatie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### E. coli kolonisatie test (uitscheiding van E. coli bestuderen)

De E. coli kolonisatie test start met het oraal inoculeren van de biggen met een mild pathogene E. coli stam. Vervolgens zal de uitscheiding van E. coli in de mest en de mestconsistentie van individuele biggen bestudeerd worden. Omdat in de praktijk de ziekteverschijnselen als gevolg van E. coli met name optreden in de eerste twee weken na spenen (van 4 tot 6 weken leeftijd), start de E. coli kolonisatie test binnen deze leeftijdscategorie. Dit is van belang omdat het immuunsysteem en maagdarmkanaal met darmmicrobioom van de biggen op die leeftijd nog volop in ontwikkeling is, en leeftijd daarom een belangrijke rol speelt in de effecten die gevonden zullen worden. De dieren in de proef zijn dan wat betreft ontwikkelingsstadium zoveel mogelijk gelijk zijn aan de dieren onder praktijkomstandigheden.

## **Uitkomstparameters**

De primaire uitkomstparameters in de E. coli kolonisatie test zijn:

1. De uitscheiding van E. coli in de mest
2. De mestconsistentie
3. De immunstatus
4. Het darmmicrobioom

De uitscheiding van E. coli in de mest en de mestconsistentie zijn de meest belangrijke parameters aangezien het in het hier beschreven onderzoek gaat om het bepalen van de afweer van biggen tegen speendiarree veroorzaakt door E. coli. Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte en medische behandelingen).

Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen omtrent de immunstatus en het darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

---

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### Inoculatie met E. coli bacteriën:

De E. coli kolonisatie test start door een bekende dosis van een mild pathogene stam van E. coli bacteriën oraal in de bek van de gespeende big te spuiten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 5 minuten
Frequentie:	1 x
Wijze:	Oraal met een spuitje in de bek

### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen, het bepalen van de uitscheiding van E. coli, het bepalen van de mestconsistentie en eventuele aanvullende parameters zoals het darmmicrobioom of vluchtige vetzuren zijn verse mestmonsters of rectale swabs nodig. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 15 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

**Onderbouwing:** De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en omvat het nemen van een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Voor het bepalen van de mestconsistentie en de uitscheiding van E. coli bij gespeende biggen is het niet mogelijk om mestmonsters vanaf de vloer te verzamelen, omdat bacteriën zich vermenigvuldigen na uitscheiding, waardoor er een vertekend beeld kan ontstaan.

Verse mestmonsters kunnen bij zeugen en biggen ook nodig zijn voor andere waarnemingen, zoals vluchtige vetzuren in de mest. Vaak worden de mestmonsters dan tevens gebruikt ter bepaling van het darmmicrobioom. Een rectale swab kan ook gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen en wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Bloedmonsters

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er bloedmonsters verzameld moeten worden.

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 3 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie, hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

**Onderbouwing:** Bloedmonsters worden genomen om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Het is met name van belang om de immuunrespons en darmintegriteit in kaart te brengen (Celi et al., 2019). Zo brengen toxines geproduceerd door E. coli een sterke immuunrespons op gang (Cox et al., 2006; Loos et al., 2012) en is er bijvoorbeeld een stijging in acute fase eiwitten en inflammatoire cytokines na E. coli toediening (o.a. Lee et al., 2012). Bloedmonsters kunnen ook vóór E. coli kolonisatie genomen worden om het werkingsmechanisme van voerstrategieën bij de zeugen of zogende biggen te achterhalen of om zeugen of biggen te genotyperen (bijv. MUC13) op gevoeligheid voor E. coli.

### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of en wanneer er monsters na euthanasie verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef, bijv. de helft van de dieren op de piek van E. coli uitscheiding en de helft van de dieren wanneer de E. coli uitscheiding sterk gedaald is. Bij methode 1 t/m 4 kan het bovendien nodig zijn monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit kan noodzakelijk zijn om de uitscheiding van E. coli, het darm microbioom, de pH en korte-keten vetzuren in verschillende segmenten van de darm te bestuderen en om bijvoorbeeld de lokale immuunrespons in de darmwand en darmontwikkeling/morfologie en -integriteit te onderzoeken.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speeksel- of urinemonsters of tonsil swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen, of vaginale swabs van zeugen.

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze speeksel:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen
Wijze urine:	Spontane urinelozing

Onderbouwing:

Dit draagt bij om het werkingsmechanisme van de voerstrategie te bestuderen. Zo kunnen er in speekselmonsters biomarkers voor de gezondheidsstatus bepaald worden, zoals antilichamen, en kunnen urinemonsters ingezet worden om de nutriëntenbenutting, en dus indirect darmgezondheid, te kunnen bestuderen.

### Vaginale swab

Dieren:	Zeugen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 4 x per cyclus

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de vagina. Dit kan relevant zijn, omdat bij de geboorte van biggen hun darm microbiota wordt gevormd door de microbiota van de zeug, inclusief de microbiota in het geboortekanaal.

### Tonsil swab

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Tonsil swabs kunnen worden ingezet om de relatie tussen darm microbiota en tonsil microbiota te onderzoeken. De inzet van probiotica bijvoorbeeld kan mogelijk de hoeveelheid substraat voor E. coli verminderen. Onderzoek van het microbioom van de tonsillen is daarom incidenteel informatief in dit type onderzoek.

### Rectale temperatuur

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	2 x daags
Moment:	Eerste 5 dagen na inoculatie

Onderbouwing: Als responsparameter is de lichaamstemperatuur momenteel nog niet onderkend als een goede voorspeller / indicator van het ziekteverloop van E. coli, omdat het onnauwkeurig kan zijn vanwege waterige uitwerpselen in het rectum, de bewegingen van het dier en stress van het hanteren. Echter, voor monitoring van de gezondheid van de biggen na inoculatie worden de biggen 2 x daags getemperatuur en vaker indien nodig.

### Handelingen die alleen in proeven met uitsluitend gespeende biggen zullen worden uitgevoerd (methode 5 in Tabel 1)

#### Behandeling met een smalspectrum antibioticum

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	3 dagen*

Wijze:	Via het drinkwater
--------	--------------------

**Onderbouwing:**

Op deze wijze wordt de uitscheiding van E. coli voor de start van de voerstrategieën gestandaardiseerd en worden mogelijke zeug effecten verminderd.

\*Wanneer verwacht wordt dat de testproducten een vergelijkbaar effect geven op E. coli uitscheiding als smalspectrum antibiotica, kan er ook een proefgroep ter vergelijking ingezet worden waarbij de biggen van spenen tot het einde van de proef via het drinkwater behandeld worden met een smalspectrum antibioticum (Luise et al., 2019).

**Referenties**

Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., Klünter, A. 2019. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology* 250: 9-31.

Cox E., Verdonck F., Vanrompay D., Goddeeris B. (2006). Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Veterinary Research* 37, 511-539.

Lee, J.S., Awji, E.G., Lee, S.J., Tassew, D.D., Park, Y.B., Park, K.S., Kim, M.K., Kim, B., Park, S.C. Effect of *Lactobacillus planetarium* CJLP243 on the growth performance of cytokine response of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci.* 2012;90:3709-3717.

Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., Trevesi, P. 2019 Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2019) 10:53.

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

Loos, M., Geens, M., Schauvliege, S., Gasthuys, F., van der Meulen, J., Dubreuil, J. D., Goddeeris, B. M., Niewold, T., & Cox, E. (2012). Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS one*, 7(7), e41041.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). **Voor de powerberekeningen wordt een significant niveau van  $\alpha < 0,05$  en een power van 0,80 aangehouden. Bij de powerberekeningen worden de primaire uitkomstparameters gebruikt. In de E. coli kolonisatietest is de primaire uitkomstparameter de uitscheiding van E. coli in de mest (in log CFU E. coli/g mest) en de mestconsistentie.** Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 10-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van E. coli en in mestconsistentie. Het exacte aantal zeugen en (zogende) biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	180	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	360	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	900	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van 5.1 lid2h .

Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op E. coli besmetting bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari -december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.
Aantal	<u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u> Gemiddeld 3 proeven x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 zeugen = 180 zeugen <u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u> In de E. coli kolonisatietest is de primaire uitkomstparameter de uitscheiding van E. coli in de mest (in log CFU E. coli/g mest) en de mestconsistentie. Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 10-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van E. coli en in mestconsistentie. Gemiddeld 3 proeven per jaar x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 dieren = 180 biggen x 5 jaar = 900 biggen die (zowel voor als) na het spenen ingezet worden om E. coli kolonisatie te volgen (matig ongerief). Vóór het spenen zullen 360 extra biggen ingezet worden om biggen te selecteren op basis van voldoende voeropname in de kraamstal of om het werkingsmechanisme van de voerstrategie vóór het spenen te bepalen (gering ongerief). In totaal worden 900 + 360 = 1260 biggen ingezet.
Geslacht	Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek. Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

### C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van 5.1 lid2h. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

#### Referenties

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.

Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluivers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, orale inoculatie met E. coli, mestmonsters, bloedafname). Ook fixatie (voor inoculatie en bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens.
- Verwacht wordt dat de dieren milde klinische verschijnselen zullen ontwikkelen na de E. coli inoculatie, waaronder diarree en een verminderde voeropname, gewichtstoename en activiteit (maar wel alert). Matige en ernstige klinische verschijnselen, en dus ook medische behandelingen en uitval, ten gevolge van de inoculatie zijn in voorafgaande proeven niet voorgekomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.



- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen).
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de E. coli inoculatie.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat ruime ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren tot minder onrust leidt. Het inoculeren gebeurt door middel van een spuitje in de bek. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt.
- Alvorens oraal E. coli toegediend zal worden aan gespeende biggen, vindt er eerst een adaptatieperiode plaats. Het spenen van biggen kan namelijk stressvol ervaren worden door de gelijktijdige veranderingen die optreden in voer en (sociale) omgeving. Door een adaptatieperiode in te lassen, vindt het toedienen van E. coli plaats op een moment welke minder stressvol is voor de biggen. Hierdoor wordt het risico op ongerief beperkt. Bovendien is dit ook noodzakelijk voor de proefopzet, omdat als de E. coli afweer test direct na spenen uitgevoerd zal worden, de resultaten zeer variabel zullen zijn wegens grote variatie in stress geassocieerd met spenen tussen de dieren.
- Er wordt gebruik gemaakt van een mild pathogene stam van E. coli bacteriën waardoor ernstige ziekteverschijnselen (zoals ernstige uitdrogingsverschijnselen) voorkomen worden. Uit voorgaande proeven op 5.1 lid2h is gebleken dat er geen toename in uitval of medische behandelingen plaatsvindt. Alhoewel sommige biggen kortdurende waterdunne diarree kunnen ontwikkelen, zal de meerderheid van de biggen slechts milde symptomen van E. coli besmetting vertonen (milde diarree / temperatuursverhoging). Biggen worden na inoculatie frequent gecontroleerd (minimaal 2 x daags).

## E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

We verwachten milde klinische verschijnselen na E. coli inoculatie. De milde klinische verschijnselen die we verwachten zijn diarree, een verminderde voeropname en verminderde activiteit (maar wel alert). Hoewel er een mild pathogene stam van E. coli gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan E. coli ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de E. coli inoculatie daarom goed te controleren wordt er op de 5 opeenvolgende dagen na de inoculatie, de rectale temperatuur van de biggen eenmaal daags gemeten, de individuele mestconsistentie eenmaal daags bepaald en worden de biggen driemaal daags (ochtend, middag en avond) gecontroleerd op klinische verschijnselen. Vanaf dag 6 na inoculatie worden de dieren tweemaal daags (ochtend en middag) gecontroleerd op klinische verschijnselen. Als er dan in de middag matige symptomen worden waargenomen, wordt er een aanvullende waarneming in de avond gedaan (en wordt in dat geval 3x daags gecontroleerd). Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. We verwachten slechts bij hoge uitzondering (0-2%) een humaan eindpunt te bereiken.

#### Milde symptomen:

- (Waterdunne) Diarree
- Verminderde voeropname
- Verminderde gewichtstoename
- Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")

Bij milde symptomen zonder dat één van de onderstaande matige of ernstige symptomen voor het maximale aantal waarnemingen optreedt zal het dier in de proef blijven.

#### Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:

- Matige uitdrogingsverschijnselen, zoals een rimpelige huid
- Trage reactie van een big
- Big trilt en biggen liggen op/tegen elkaar
- Rectale temperatuur >40°C (\*)
- Verhoogde ademhaling (>50 per min.), meestal als gevolg van koorts
- Overgeven

Bij het optreden van matige symptomen zal de huid turgor en slijmvliezen gecontroleerd worden. Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

\* Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur >40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef worden gehaald wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van  $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$  heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.

#### Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan E. coli gerelateerd zijn:

- Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging
- Rectale temperatuur <39 °C
- Ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor (huidplooi blijft staan) of diep ingevallen ogen
- Afwijkende kleur van de slijmvliezen
- Bloederige diarree
- Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie
- Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen

De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

---

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

0-2%

---

## **F. Classificatie van ongerief**

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

---

Het cumulatieve ongerief van E. coli inoculatie, van de bemonsteringen en van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (63% van de dieren). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (37% van de dieren). Het ontbreken van eetbare hokverrijking is in de ongeriefsclassificatie meegenomen.

### G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In <i>in vitro</i> onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen <i>in vitro</i> studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.
Vermindering	De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op 5.1 lid2h en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.
Verfijning	De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

---

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. **Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD.** Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

---

## I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

---

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

---

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

---

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Biggen die geïnoculeerd zijn, worden aan het einde van de proef opgeofferd in het kader van de proef of na afloop van de proef gedood in het kader van bioveiligheid (voorkomen van verspreiding van de ingezette E. coli op het onderzoeksbedrijf).

Onderzoek van weefsels en organen na euthanasie zal bij onderzoeksvragen naar het werkingsmechanisme van de strategieën, bijdragen aan de interpretatie van de resultaten: bijvoorbeeld het microbiom in verschillende segmenten van de darm is hierbij van belang.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

---

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

In het kader van de bioveiligheid en het welzijn van de andere dieren op het onderzoeksbedrijf zullen dieren die in het kader van de proef geïnoculeerd zijn met E. coli geëuthanaseerd worden. Herplaatsing is om deze reden in de opinie van 5.1 lid2h geen goede optie.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
2	Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## Inleiding

Streptococcus suis (S. suis) infectie is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsproblemen bij gespeende biggen. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen de strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en (reeds in de praktijk ingezette) autovaccins. Zoals omschreven in het projectvoorstel, zijn biggen extra gevoelig voor S. suis infecties na het spenen, omdat de afweer van de dieren dan verminderd is door stress van het spenen (o.a. transport stress en verandering in voer), waardoor S. suis makkelijker kan koloniseren. Bovendien ontstaat door de nieuwe groepssamenstelling na het spenen de kans dat een varken besmet met virulente S. suis stam de andere biggen in de groep besmet.

Omdat er uit onderzoek van 5.1 lid2h en de literatuur is gebleken dat S. suis overgedragen kan worden van zeug op big tijdens geboorte en lactatie en tussen biggen onderling zullen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven in deze bijlage niet alleen toegepast in het voer voor gespeende biggen, maar kunnen deze ook gegeven worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen. In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op het risico op S. suis kolonisatie. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden. Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën toegepast worden in de praktijk om zo de kolonisatie van S. suis bij gespeende biggen te verminderen, en daarmee het welzijn en de gezondheid van varkens te verbeteren (minder ontstekingen), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica te verminderen. Daarnaast wordt de pathogenese van S. suis tot dusver nog niet volledig begrepen en zal de kennis verworven met proeven in deze bijlage bijdragen om deze beter in kaart te brengen (bijv. rol pariteit zeug, geboorte gewicht biggen).

## Experimentele aanpak

Er is veel diversiteit (verschillende serotypes) binnen S. suis. Niet al deze serotypes worden wereldwijd even vaak aangetroffen en er zijn regionale verschillen in het voorkomen van serotypes. De S. suis stam op 5.1 lid2h is gekarakteriseerd op serotype, zodat het onderzoek uitgevoerd wordt met een voor de praktijk relevante S. suis stam. De afgelopen jaren is uit onderzoek op 5.1 lid2h gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen de tonsil en darm kolonisatie van biggen in de kraamstal beïnvloed kan worden, welke vervolgens een grote rol spelen in gezondheid van biggen na spenen. Naast voeding van zeug en biggen voor spenen, speelt ook de (abrupte) voerovergang op het moment van spenen een rol in het risico op symptomen van S. suis na het spenen, waardoor het belangrijk kan zijn onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom wordt onderzoek gedaan met proefopzetten waarin de voeding van de zeug, de zogende big en/of de gespeende big een rol kan spelen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethodes

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)		
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gespeende biggen		Inoculatie S. suis gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van inoculatie	Hergroeperen / verplaatsen <sup>c</sup> gespeende biggen
1	Ja				Ja	Dag 4	Ja
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4	Ja
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4	Ja
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-21	Ja
5			Ja	Ja	Ja	Dag 4-21	Ja

<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in de kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van inoculatie is afhankelijk van de lengte van de proefvoeradaptatieperiode van het testproduct

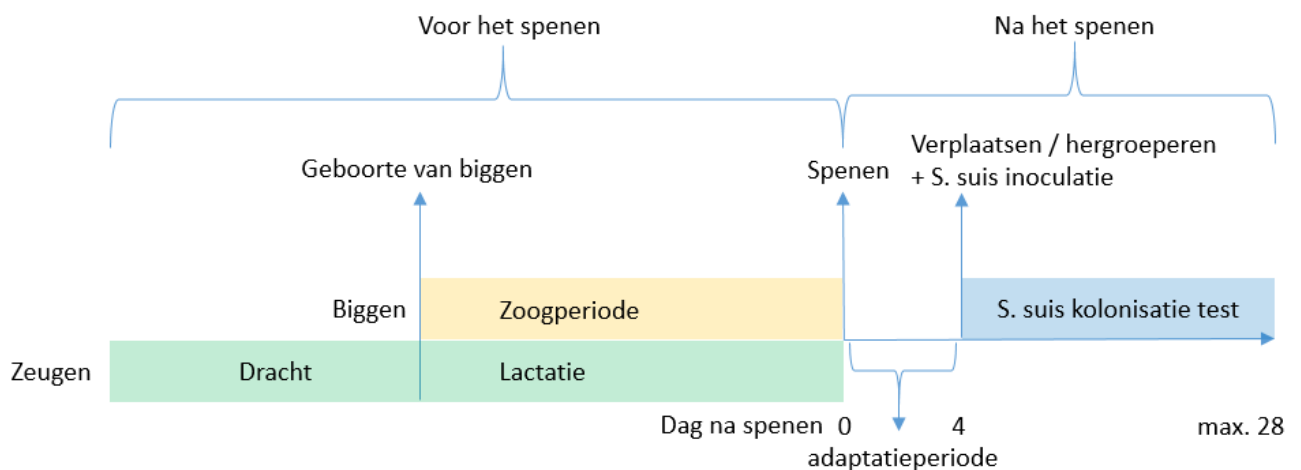
<sup>c</sup> Hergroeperen of verplaatsen van de gespeende biggen zodat S. suis zich beter kan koloniseren

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op S. suis kolonisatie na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te inoculeren na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab kan worden bekeken of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen. Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnoculeerd worden met *S. suis* op dag 4 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnoculeerd kunnen worden met *S. suis*. Het moment van inoculeren is dus flexibel, maar wel altijd tussen 4 en 21 dagen na het spenen.

**Ad c.** Om de *S. suis* beter te laten aanslaan worden de biggen voor inoculatie verplaatst en gehergroepeerd. Dit is onderdeel van het model om de haalbaarheid van de proef te vergroten. Zoals in het projectvoorstel is benoemd, is transport een van de factoren die een rol spelen bij het koloniseren van *S. suis*.

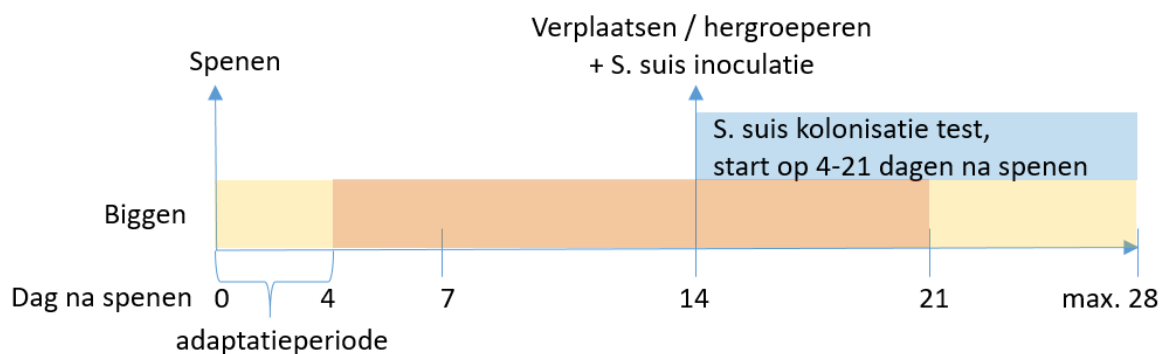
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerderperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnoculeerd met *S. suis*.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van deze proefvoerderperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 3 weken, waarna de biggen geïnoculeerd worden met *S. suis*. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerderperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de *S. suis* inoculatie kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.



## **Algemeen**

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen voeren. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 3 weken, waardoor de S. suis kolonisatie test zal starten op 4-21 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de S. suis kolonisatie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### S. suis kolonisatie test (uitscheiding van S. suis bestuderen)

- Verplaatsen / hergroeperen:  
Na de adaptatieperiode wordt een verandering in de fysieke en/of sociale omgeving aangebracht. Bijvoorbeeld door de dieren te verplaatsen van de gespeende biggenstal naar de lab faciliteiten. Dit wordt gedaan om de infectie beter te laten verlopen (Swildens et al., 2004; 5.1 lid2h, 5.1 lid2e), aangezien S. suis een korte levensduur heeft en makkelijker kan koloniseren bij een verminderde afweer door stress. Uit voorgaande proeven op 5.1 lid2h blijkt namelijk dat na het verplaatsen en hergroeperen van de biggen S. suis zich gemakkelijker kan koloniseren, waardoor de resultaten van de proef verbeterd worden.
- Inoculatie:  
Op dezelfde dag als deze fysieke en/of sociale omgevingsverandering worden de dieren vervolgens oraal en nasaal geïnoculeerd met een mild pathogene stam van S. suis bacteriën, waarna de uitscheiding van S. suis op de tonsillen bestudeerd zal worden over de tijd. De S. suis kolonisatie test eindigt door de dieren te euthanaseren, waarna de kolonisatie van S. suis in het ileum bestudeerd zal worden. De dieren worden zowel oraal als nasaal geïnoculeerd, omdat uit onderzoek op het is gebleken dat inoculatie via enkel de orale route onvoldoende is om de gewenste besmettingsgraad te bereiken. Er is een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen, omdat als de biggen direct na het spenen geïnoculeerd zouden worden met S. suis de resultaten zeer variabel zullen zijn wegens grote variatie in stress geassocieerd met de voerovergang op spenen en wegens grote variatie en lage voeropname de eerste dagen na spenen.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameters in de S. suis kolonisatie test zijn:

1. De kolonisatie van S. suis op de tonsillen
2. De kolonisatie van S. suis in de darminhoud van het ileum

Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte, en medische behandelingen). Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen omtrent de immuunstatus en het tonsil- en darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

---

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### S. suis kolonisatie test

#### a. Transport + hergroeperen

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	1 uur
Frequentie:	1 x

Onderbouwing: De dieren worden blootgesteld aan transport en hergroepering om een gestandaardiseerd stress moment in te bouwen waardoor de S. suis bacteriën goed aanslaan. Het is een methode die lijkt op de omstandigheden in de praktijk waarvan bekend is dat ze effect hebben op het verloop van de infectie: voor de proef worden deze op een gestandaardiseerde wijze uitgevoerd.

#### b. Inoculatie:

De inoculatie bestaat uit een combinatie van oraal en nasaal inoculeren. Het orale inoculeren gebeurt met behulp van een spuitje in de bek van het dier. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Het nasale inoculeren gebeurt met behulp van een airbrush, waarbij druppels inoculum in de neus van de biggen gesprayd worden, waarna het inoculum verder ingeademd zal worden door de biggen. De orale en nasale inoculatie vinden gelijktijdig plaats.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 5 minuten
Frequentie:	1 x
Wijze:	Oraal met een spuitje in de bek en nasaal met een airbrush

#### Tonsil swabs

In iedere proef zullen tonsil swabs bij de gespeende biggen genomen worden om de kolonisatie van S. suis op de tonsillen te bestuderen. Verder wordt in iedere proef een afweging gemaakt of er ook tonsil swabs nodig zijn bij de zeugen en biggen in de kraamstal.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 12 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Voor het bestuderen van de kolonisatie van S. suis op de tonsillen zijn tonsil swabs nodig. Naast S. suis bacteriën kan ook het gehele tonsil microbioom op deze manier bestudeerd worden om het werkingsmechanisme beter te begrijpen. Door zowel de zeug en haar biggen te bemonsteren kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

#### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef worden monsters na euthanasie verzameld voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef. Bij methode 1 t/m 4 kan het nodig zijn ook monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit is na S. suis inoculatie noodzakelijk voor het bestuderen van de kolonisatie van S. suis in verschillende organen en weefsels, zoals in de darminhoud van de ileum. Naast het bepalen van de S. suis bacteriën in de darminhoud kan ook het totale darm microbioom bestudeerd worden.

#### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen zijn rectale swabs nodig. Verder wordt in iedere proef een afweging gemaakt of er mestmonsters of rectale swabs verzameld moeten worden bij zeugen en/of biggen om de onderzoeksvraag te beantwoorden. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 8 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en omvat het nemen van

een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Verse mestmonsters kunnen nodig zijn om de uitscheiding van *S. suis* via de mest te bepalen. De analyse op *S. suis* bacteriën laat het niet toe om mestmonsters vanaf de vloer te verzamelen, omdat bacteriën zich vermenigvuldigen na uitscheiding, waardoor er een vertekend beeld kan ontstaan. Een vers mestmonster of rectale swab kan ook gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen. Een rectale swab wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters of rectale swabs bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Bloedmonsters

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er bloedmonsters verzameld moeten worden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie, hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

Onderbouwing: Bloedmonsters worden genomen voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, bijvoorbeeld om anti-*S. suis* antilichamen in het bloed van biggen, en zeugen (bijv. voor en na vaccinatie), te meten.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speekselmonsters en neus swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen, of vaginale swabs en biest van de zeugen.

#### Speeksel

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen

Onderbouwing: Ter bepaling van biomarkers voor de gezondheidsstatus, bijvoorbeeld antilichamen, of het bepalen van bacteriën in de mondholte.

#### Neus swab

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 10 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de neus. Dit kan relevant zijn, omdat dit de eerste plek is waar luchtweg microben een barrière tegenkomen.

#### Vaginale swab

Dieren:	Zeugen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 4 x per cyclus

Onderbouwing: Ter bepaling van de microbiële populaties in de vagina. Dit kan relevant zijn, omdat bij de geboorte van biggen de microbiota in het geboortekanaal van de zeug van invloed zijn op de ontwikkeling van de darm microbiota van de big.

#### Biest

Dieren:	Zeugen
Frequentie:	1 x, binnen 24 uur na geboorte van de biggen
Wijze:	Met de hand melken

Onderbouwing: Ter bepaling van anti-*S. suis* antilichamen in de biest.

## Rectale temperatuur

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	2 x daags
Moment:	Eerste 4 dagen na inoculatie

### Onderbouwing:

Als responsparameter is de lichaamstemperatuur momenteel nog niet onderkend als een goede voorspeller / indicator van het ziekteverloop van *S. suis*. Echter, voor monitoring van de gezondheid van de biggen na inoculatie worden de biggen 2 x daags getemperatuur en vaker indien nodig.

### Referenties

Choudhury, R., Middelkoop, A., Bolhuis, J. E., & Kleerebezem, M. 2019. Legitimate and Reliable Determination of the Age-Related Intestinal Microbiome in Young Piglets; Rectal Swabs and Fecal Samples Provide Comparable Insights. *Frontiers in microbiology* 10, 1886.

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

Swildens B, Stockhofe-Zurwieden N, van der Meulen J, Wisselink HJ, Nielen M and Niewold TA (2004) Intestinal translocation of *Streptococcus suis* type 2 EF+ in pigs. *Vet Microbiol* 103, 29– 33.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). Voor de powerberekeningen wordt een significant niveau van  $\alpha < 0,05$  en een power van 0,80 aangehouden. Bij de powerberekeningen worden de primaire uitkomstparameters gebruikt. In de *S. suis* kolonisatietest is de primaire uitkomstparameter de kolonisatie van *S. suis* in het ileum (in log CFU *S. suis*/ml darminhoud). Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van *S. suis*. Het exacte aantal zeugen en (zogende) biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	180	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	240	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	600	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van 5.1 lid2h .
Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op <i>S. suis</i> besmetting bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari -december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.

Aantal	<p><u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u>  Gemiddeld 3 proeven x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 zeugen = 180 zeugen.</p> <p><u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u>  In de S. suis kolonisatietest is de primaire uitkomstparameter de kolonisatie van S. suis in het ileum (in log CFU S. suis/ml darminhoud). Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in de uitscheiding van S. suis. Gemiddeld 2 proeven per jaar x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 dieren = 120 biggen x 5 jaar = 600 biggen die (zowel voor als) na het spenen ingezet worden om S. suis kolonisatie te volgen (matig ongerief). Vóór het spenen zullen 240 extra biggen ingezet worden om biggen te selecteren op basis van voldoende voeropname in de kraamstal of om het werkingsmechanisme van de voerstrategie vóór het spenen te bepalen (gering ongerief). In totaal worden 600 + 240 = 840 biggen ingezet.</p>
Geslacht	<p>Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek.</p> <p>Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.</p>
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

### C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op het risico voor S. suis infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten, of in de gespeende biggenstal (in groepen van 6 biggen per hok) van 5.1 lid2h waarna ze vóór S. suis inoculatie naar de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) zullen verhuizen. De S. suis kolonisatie test vindt dus altijd plaats in de lab faciliteiten. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur.

De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voordoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, het minimale bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de S. suis bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van twee niet-eetbare speeltjes, waarvan één dagelijks wordt gewisseld met een ander speeltje.

#### Referenties

- Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.
- Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluijvers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.

---

## D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanpakken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

---

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, inoculatie met *S. suis*, tonsil swabs, bloedafname, mestmonsters). Ook fixatie (voor inoculatie en bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens. De gespeende biggen worden ook blootgesteld worden aan transport, verplaatsen en/of hergroeperen om kolonisatie van *S. suis* te faciliteren.
- De *S. suis* kolonisatie test zal leiden tot matige ziekteverschijnselen, zoals een kortdurende verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte kreupelheid (beginnende gewrichtsontsteking indien veroorzaakt door de *S. Suis*). We verwachten op basis van voorgaande proeven geen toename in medische behandelingen of uitval.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen, transport, verplaatsen). Sociale interacties kunnen toenemen als gevolg van nieuwe hokgenoten, wat tijdelijk enige agressie zal oproepen wegens het bepalen van een nieuwe dominantie hiërarchie.
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de *S. suis* inoculatie.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat veel ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren van de dieren tot minder onrust leidt. Het inoculeren gebeurt door middel van een spuitje in de bek en spray in de neus. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt.
- Er wordt gebruik gemaakt van een mild pathogene stam van *S. suis* bacteriën waardoor ernstige ziekteverschijnselen voorkomen worden. Uit welzijnsevaluaties van eerdere proeven verwachten we geen toename in uitval en het aantal medisch behandelde dieren.

---

## E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

We verwachten matige klinische verschijnselen na *S. suis* inoculatie. De matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn een verhoogde lichaamstemperatuur en/of lichte kreupelheid (t.g.v. beginnende gewrichtsontsteking indien veroorzaakt door de *S. suis* besmetting). Hoewel er een mild pathogene stam van *S. suis* gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan *S. suis* ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de *S. suis* inoculatie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen tweemaal daags gemeten voor 4 dagen na *S. suis* inoculatie en worden de biggen minimaal driemaal daags (ochtend, middag en avond) gecontroleerd op klinische verschijnselen voor ten minste 4 dagen na inoculatie. Vanaf dag 5 na inoculatie worden de dieren tweemaal daags (ochtend en middag) gecontroleerd op klinische verschijnselen. Als er dan in de middag matige symptomen worden waargenomen, wordt er een aanvullende waarneming in de avond gedaan (en wordt in dat geval 3x daags gecontroleerd). Alle bekende klinische verschijnselen die kunnen optreden bij *S. suis* zijn opgenomen in een schema waarin is aangegeven bij welke ernst en duur van de symptomen een humaan eindpunt bereikt is. We verwachten slechts bij hoge uitzondering (0-3%) een humaan eindpunt te bereiken. *S. suis* kent geen milde klinische symptomen. Hieronder worden de matige en ernstige symptomen weergegeven:

Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:

- Trage reactie van een big
- Rectale temperatuur >40°C (\*)
- Verhoogde ademhaling (>50 per min.), meestal als gevolg van koorts.
- Zichtbare kreupelheid aan 1 poot waarbij de gewrichten niet gezwollen zijn en het dier deze nog wil belasten

Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

\*Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur >40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van  $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$  heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.

Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan *S. suis* gerelateerd zijn:

- Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging
- Duidelijke symptomen van hersenverschijnselen die wijzen op meningitis, zoals
  - Evenwichtsstoornissen
  - Slechte coördinatie
  - Kopschudden,
  - Op 1 zijde liggen,
  - Snelle oogbewegingen,
  - Gestrekte nek, opisthotonus
- Duidelijke symptomen van sepsis, zoals de combinatie van een rectale temperatuur >40°C en niet aan te sporen tot beweging.
- Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen
- Ernstige kreupelheid aan 1 of meer gewrichten waarbij het gewricht zichtbaar gezwollen is en het dier deze niet meer wil belasten / niet meer wilt lopen (arthritis / poly-arthritis)
- Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie

De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

---

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

0-3 %

---

## **F. Classificatie van ongerief**

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van *S. suis* inoculatie, van de bemonsteringen en van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (59% van de dieren). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (41% van de dieren). Het ontbreken van eetbare hokverrijking is in de ongeriefsclassificatie meegenomen.

---

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	<p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op <i>S. suis</i> kolonisatie is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door <i>S. suis</i>. Dit is de meest gestelde diagnose voor gezondheidsprobleem bij gespeende biggen. De microbiom kolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de <i>S. suis</i> bacteriën). In <i>in vitro</i> onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen <i>in vitro</i> studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met <i>S. suis</i> niet vervangen.</p>
Vermindering	<p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op 5.1 lid2h en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in tonsil/neus/ rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de <i>S. suis</i> afweer test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen <i>S. suis</i> inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met <i>S. suis</i> geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden <i>S. suis</i> op de tonsillen hebben dan biggen die wel met <i>S. suis</i> geïnoculeerd worden. In de huidige proeven geeft zo'n blanco groep daarom geen additionele informatie meer en is de test zodanig opgezet dat met een negatieve en positieve controle volstaan kan worden. In de <i>S. suis</i> kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan in een observationele studie, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
Verfijning	<p>De <i>S. suis</i> kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van <i>S. Suis</i> bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De <i>S. suis</i> bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten en nasaal in de neus van de big gesprayed. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Op de dag van euthanasie worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om de onrust voor de dieren zo minimaal mogelijk te houden. Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in tonsil/neus/rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee



Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. **Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD.** Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

## I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

## K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De gespeende biggen die geïnoculeerd zijn met S. suis worden gedood in het kader van de proef om de kolonisatie van S. suis na inoculatie in verschillende organen te bepalen.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
3	Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

## Achtergrond

Na het spenen zijn biggen extra gevoelig voor infectieuze ziektes, omdat de verandering van voeding (van melk naar vast voer) en omgeving vaak leidt tot een onregelmatiger eetpatroon / onvoldoende voeropname. Dit kan leiden tot een (steriele) ontsteking van de darm en oxidatieve stress. Hierbij speelt ook een rol dat het maag-darmkanaal en het immuunsysteem van biggen nog niet volledig ontwikkeld is. Biggen zijn daarnaast gevoeliger omdat zij na het spenen niet meer beschermd worden door passieve immuniteit van de zeug. Proeven onder deze bijlage hebben daarom als doel om de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven te bepalen op de immuun competentie van gespeende biggen. In het projectvoorstel zijn de voer(productie)strategieën en voeradditieven (in voer of drinkwater) gedefinieerd. Daarnaast kunnen interacties tussen de strategieën getest worden, evenals de interactie tussen voeding en in de praktijk ingezette vaccins.

De 5.1 lid2h in deze bijlage zullen niet alleen toegepast worden in het voer voor gespeende biggen. Deze kunnen ook gegeven worden aan (dragende en/of lacterende) zeugen en zogende biggen, omdat uit de literatuur is gebleken dat deze de ontwikkeling van het immuunsysteem van biggen en de (latere) immuunrespons kunnen beïnvloeden.

In deze bijlage gaat het specifiek om voer(productie)strategieën en voeradditieven die hun invloed uitoefenen op de immuun competentie van biggen. De voeders worden zo samengesteld (binnen de Europese normstellingen) dat de werking van het te testen voeradditief goed aangetoond kan worden (zo kan bijvoorbeeld het gevoerde niveau aan antioxidanten op de minimumbehoefte-norm ingesteld worden). Met de resultaten uit deze bijlage kunnen effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën toegepast worden in de praktijk om zo de immuun competentie, en daarmee het welzijn, van varkens te verbeteren (minder ziekte en sterfte), en het gebruik van antimicrobiële middelen zoals antibiotica en zink te verminderen.

## Experimentele aanpak

De afgelopen jaren is uit onderzoek in de literatuur gebleken dat middels voerstrategieën in de zeugen (Bass et al., 2012; Luo et al., 2020) en zogende biggen (de Vries et al., 2020) de ontwikkeling van het immuunsysteem van biggen en de (latere) immuunrespons beïnvloed kan worden. De voerovergang bij spenen speelt bovendien een belangrijke rol in de darmmorfologie en -integriteit na het spenen, waardoor het belangrijk is onderzoek te doen naar de samenstelling van het vaste voer dat biggen in de kraamstal krijgen. Daarom zijn in deze vervolgaanvraag ook zeugen en zogende biggen opgenomen. Dit betekent dat er 5 onderzoeksmethoden kunnen worden gebruikt (Tabel 1). In onderstaande tabel zijn deze weergegeven samen met de belangrijkste kenmerken van de proefopzet per onderzoeksmethode.

Tabel 1. Overzicht van de onderzoeksmethodes

Methode	Proefvoer wordt gegeven aan:			Selectie <sup>a</sup> biggen bij spenen	Na spenen (= dag 0)	
	Zeug dracht en/of lactatie	Zogende biggen	Gespeende biggen		Tweemaal LPS injectie (tussentijd 2 weken) gespeende biggen	Moment <sup>b</sup> van eerste LPS injectie
1	Ja				Ja	Dag 4
2	Ja	Ja		Ja	Ja	Dag 4
3		Ja		Ja	Ja	Dag 4
4		Ja	Ja	Ja	Ja	Dag 4-14
5			Ja	Ja	Ja	Dag 4-14

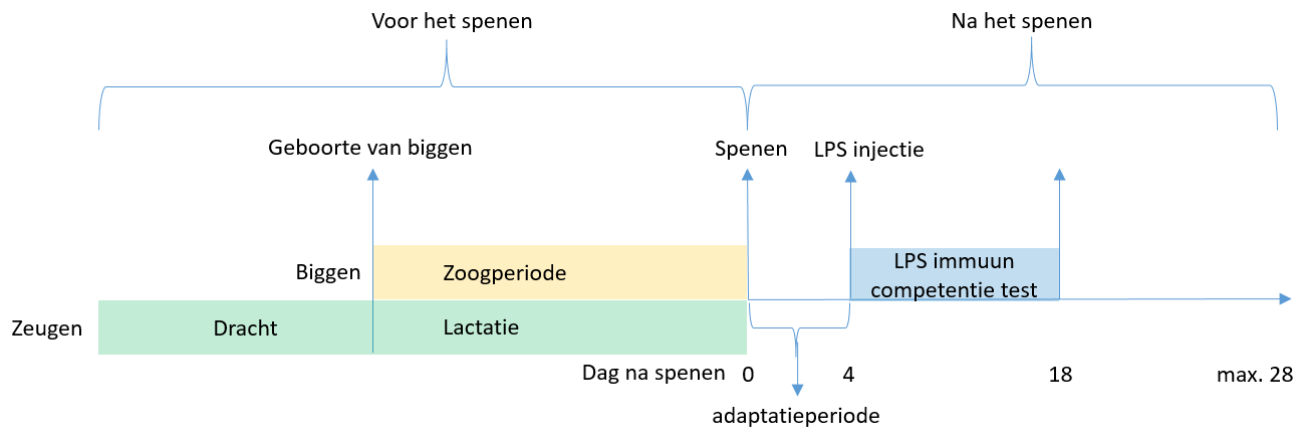
<sup>a</sup> Selectie van biggen op basis van voeropname in kraamstal

<sup>b</sup> Het moment van de eerste injectie met LPS is afhankelijk van de lengte van de proefvoeraadaptatieperiode van het testproduct

**Ad a.** Bij methode 2, 3 en 4 wordt het effect van de vaste voeding van de big in de kraamstal op de reactie van het immuunsysteem na spenen onderzocht. Om relevante resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk om alleen die biggen te injecteren met LPS na het spenen, die voldoende vast voer hebben gegeten tijdens de zoogperiode. Om dit te testen wordt een inerte kleurstof aan het voer in de kraamstal toegevoegd. Met behulp van een rectale swab kan worden bekeken of de kleurstof in de mest van de big aanwezig is. Daarmee wordt duidelijk of de big het proefvoer in de kraamstal goed heeft opgenomen. Wanneer de biggen het voer niet opnemen, zal er een no go plaatsvinden en zullen de biggen niet ingezet worden in de proef na spenen.

**Ad b.** Voor alle biggen die geen proefbehandeling meer krijgen na het spenen (methode 1, 2 en 3) geldt dat zij geïnjecteerd worden met LPS op dag 4 en dag 18 na het spenen. Voor biggen die nog een proefbehandeling krijgen na het spenen geldt dat zij voldoende lang de proefbehandeling moeten hebben gekregen voordat ze geïnjecteerd kunnen worden met LPS. Het moment van injecteren is dus flexibel, maar de eerste injectie is wel altijd tussen 4 en 14 dagen na het spenen.

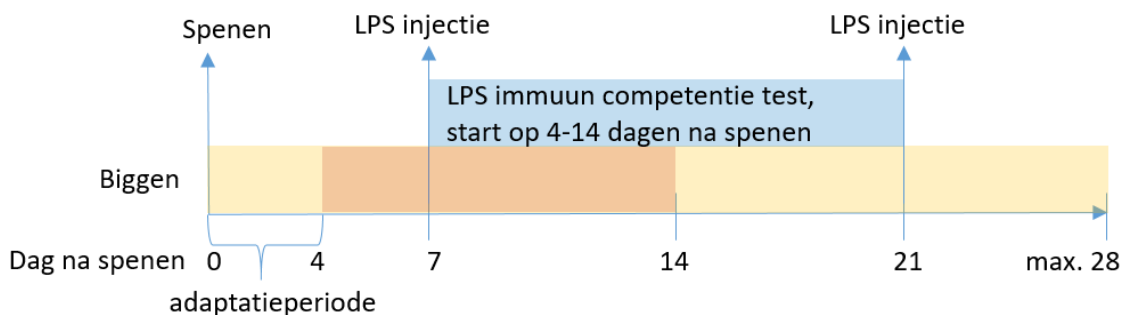
In onderstaande figuren wordt het tijdsverloop in de proeven weergegeven. In Figuur 1 wordt onderzoek van voeders bij zeugen en/of zogende biggen weergegeven (methode 1 t/m 3 in Tabel 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de proefopzet bij de methoden waarbij zeugen en/of zogende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerperiode van de biggen. Groen = maximale proefvoerperiode van de zeugen. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

In Figuur 2 wordt de proefopzet weergegeven voor proeven naar voeders bij gespeende biggen (methode 4 en 5 in Tabel 1).

- Methode 4: Biggen die al voor het spenen proefvoer verstrekt krijgen kunnen ook na het spenen nog proefvoer krijgen (bijv. zoals in een 2x2 opzet). Na een periode waarin de dieren kunnen wennen aan het proefvoer, worden zij geïnjecteerd met LPS.
- Methode 5: Biggen die uitsluitend na het spenen proefbehandelingen krijgen, worden gevoerd met proefvoerders, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen oefenen. De lengte van deze proefvoerperiode zal per proef bekeken worden en kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waarna de biggen voor het eerst geïnjecteerd worden met LPS.



Figuur 2. Schematische weergave van de proefopzet bij methoden waarbij gespeende biggen een proefbehandeling krijgen. Geel = maximale proefvoerperiode van de biggen. Oranje = periode waarin de LPS immunocompetentie test kan starten. Dit is afhankelijk van de inwerktijd van het testproduct. De biggen worden voor maximaal 4 weken na spenen gevolgd.

## Algemeen

### Adaptatie- en proefvoerperiode (gewenning aan hok, hokgenoten en experimenteel voer)

De proeven bestaan uit een adaptatieperiode van ten minste 4 dagen na het spenen (Figuur 1 en 2) waarin de dieren wennen aan de nieuwe situatie (nieuw hok en nieuwe hokgenoten) en de voeropname van de biggen zich kan normaliseren en stabiliseren. Bij voerstrategieën na het spenen is er ook een proefvoeradaptatieperiode vereist, waarbij het testproduct in het voer of de voerstrategie de tijd krijgt om zijn potentiële werking uit te kunnen oefenen. De lengte van de proefvoeradaptatieperiode zal per proef bekeken worden. Dit kan variëren van enkele dagen tot max. 2 weken, waardoor de LPS immunocompetentie test zal starten op 4-14 dagen na spenen (Figuur 2). Wanneer er voerstrategieën getest worden die na het spenen verstrekt worden zal de LPS immunocompetentie test dus later na het spenen uitgevoerd worden dan wanneer er voerstrategieën vóór het spenen getest worden, omdat dan het 'carry-over' effect bestudeerd wordt.

### LPS immuun competentie test (bestuderen van ontsteking en oxidatieve stress)

De LPS immuun competentie test omvat het intramusculair injecteren van gespeende biggen met zuiver LPS in een lage dosering, waarna op 1,5 en 3 uur na injectie een bloedmonster genomen zal worden om biomarkers voor ontsteking, namelijk cytokines en acutefase-eiwitten, en eventueel biomarkers voor oxidatieve stress te meten. Wanneer zuiver LPS wordt geïnjecteerd, dus zonder andere bacterie deeltjes, wordt een ontstekingsreactie opgeroepen, die snel weer verdwijnt. De effecten van een LPS injectie houden namelijk ongeveer 4 uur aan, waarna het dier herstelt. De ontstekingsreactie resulteert in een verhoging van de lichaamstemperatuur, welke gemonitord zal worden na injectie. Na twee weken krijgen de dieren nogmaals een gelijke dosis LPS intramusculair toegediend. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via *E. coli* bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de response te uniformeren en de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. 5.1 lid1c

(5.1 lid2h, 5.1 lid2e). Ook na de tweede injectie met LPS wordt op 1,5 en 3 uur na injectie een bloedmonster genomen.

Als controle voor de LPS immuun competentie test kan een proefgroep geïnjecteerd worden met Phosphate Buffered Saline (PBS), een verdunningsmiddel dat neutraal is voor het dier. Hierdoor kan het effect van het handelen van het dier en de injectie worden vergeleken met de daadwerkelijke respons op LPS in relatie met de voerstrategie.

Omdat in de praktijk de biggen het meest gevoelig zijn in de eerste twee weken na spenen (van 4 tot 6 weken leeftijd, zie uitleg in projectvoorstel), start de LPS immuun competentie test binnen deze leeftijds categorie. Dit is van belang omdat er geen passieve immuniteit van de zeug meer is en het immuunsysteem en maagdarmkanaal met darmmicrobioom van de biggen op die leeftijd nog volop in ontwikkeling is, en leeftijd daarom een belangrijke rol speelt in de effecten die gevonden zullen worden. De dieren in de proef zijn dan wat betreft ontwikkelingsstadium zoveel mogelijk gelijk zijn aan de dieren onder praktijkomstandigheden.

### **Uitkomstparameters**

De primaire uitkomstparameters in de LPS immuun competentie test zijn:

1. Cytokines
2. Acutefase-eiwitten
3. Rectale temperatuur
4. Biomarkers voor oxidatieve stress
5. Lever enzymen

Aanvullend kan ook de activiteit van het dier gescoord worden. Daarnaast worden de volgende technische resultaten altijd vastgelegd: voeropname, startgewicht, eindgewicht, groei, voederconversie, en observaties ten behoeve van de gezondheid van het dier (registratie van mortaliteit, ziekte en medische behandelingen). Voor zeugen worden ook de spekontwikkeling, het aantal geboren biggen, toomgewicht bij geboorte en spenen en het aantal gespeende biggen gerapporteerd. Om het werkingsmechanisme te begrijpen kunnen aanvullend monsters genomen worden bij zeugen en biggen om trent de immuunstatus, antioxidant status en het darmmicrobioom. De bemonsteringen worden hieronder verder toegelicht.

### Referenties

- Bass, Benjamin Edward. 2012. Influence of Nutritional Modifications on Sow, Litter, and Nursery Performance. Theses and Dissertations.
- Luo, W., Xy, W., Zhang, J., Yao, J. and Xu, J. 2020. The Maternal Diet with Fish Oil Might Decrease the Oxidative Stress and Inflammatory Response in Sows, but Increase the Susceptibility to Inflammatory Stimulation in their offspring. *Animals* 10, 1455.
- De Vries, H., M. Geervliet, C.A. Jansen, V.P.M.G. Rutten, H. van Hees, N. Groothuis et al. 2020. Impact of Yeast-Derived  $\beta$ -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. *Microorganisms* 8, 1573

5.1 lid2h

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

## Handelingen die (kunnen) worden uitgevoerd in de onderzoeksmethoden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1)

### LPS immuun competentie test

De LPS immuun competentie test start door een bekende, lage dosis van LPS intramusculair in het varken te injecteren. Twee weken later wordt een gelijke dosis opnieuw intramusculair geïnjecteerd.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Maximaal 1 minuut
Frequentie:	2 injecties met een tussenperiode van 2 weken
Wijze:	Intramusculaire injectie

Onderbouwing: De dieren worden tweemaal geïnjecteerd om de individuele variatie te verkleinen. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. [5.1 lid1c](#)

5.1 lid2h, 5.1 lid2

### Bloedmonsters

In iedere proef worden bloedmonsters genomen bij gespeende biggen op 1,5 en 3 uur na de twee LPS (of PBS) injecties. Verder wordt er in iedere proef een afweging gemaakt of er aanvullende bloedmonsters nodig zijn bij de biggen en/of zeugen om de onderzoeksvraag te beantwoorden.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur:	Maximaal 2 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 3 bloedmonsters per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 10 bloedmonsters van geboorte tot 4 weken na spenen
Plaats:	Vena Jugularis en bij kleine hoeveelheden eventueel de oorvene
Volume:	Afhankelijk van bloedafname frequentie (rekening houdend met de korte duur tussen de bloedafname momenten na de injecties), hoeveelheid en type analyses, in ieder geval ver beneden het percentage van het circulerende bloedvolume aangegeven door NC3Rs

Onderbouwing: Bloedmonsters worden op 1,5 en 3 uur na de twee LPS (of PBS) injecties genomen om cytokines en acute-fase eiwitten te meten, dus in totaal 4 bloedmonsters. Daarnaast wordt in iedere proef een afweging gemaakt of ook op latere tijdstippen na injectie, bijvoorbeeld op 6, 12 of 24 uur na injectie bloed afgenomen zal worden, omdat sommige acute fase eiwitten later opkomen (Llamas Moya et al., 2006). Bloedmonsters kunnen ook o.a. gebruikt worden om de antioxidant status te bepalen. Daarnaast kunnen aanvullend bloedmonsters genomen worden bij biggen en/of zeugen om de effectiviteit van de voeradditieven en voer(productie)strategieën op het basale niveau (zonder immuun activatie) van de immuun parameters te bestuderen.

### Rectale temperatuur

In iedere proef wordt de rectale temperatuur van de gespeende biggen gemeten voorafgaand aan de LPS (of PBS) injecties, en maximaal 5 x na de injectie.

Dieren:	Gespeende biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie:	Maximaal 12 x
Moment:	1 x voorafgaand aan injectie en maximaal 5 x binnen 24 uur na injectie

Onderbouwing: De rectale temperatuur wordt gemeten om de ontstekingsrespons in kaart te brengen.

### Mestmonsters, rectale swabs:

Voor het selecteren van biggen bij spenen en eventuele aanvullende parameters zijn verse mestmonsters of rectale swabs nodig. Verse mestmonsters worden verkregen middels rectale stimulatie met bijvoorbeeld een thermometer of wattenstaafje. De mest kan vervolgens opgevangen worden. In iedere proef wordt een afweging gemaakt of er mestmonsters verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Zeugen en biggen
Duur verse mest:	Gemiddeld 3 minuten
Frequentie rectale swab:	Gemiddeld 1 minuut
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 8 x in de periode vanaf geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: De selectie van biggen die tijdens de zoogperiode voldoende vast voer opnemen wordt gedaan middels een inerte kleurmarker in het vaste voer van de zogende biggen en om vat het nemen van

een rectale swab en het visueel beoordelen van de kleur van de swab (maximaal 5 x). Biggen met de kleur van de kleurmarker op de swab worden geclassificeerd als "eters".

Verse mestmonsters kunnen nodig zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, bijvoorbeeld voor het bepalen van de antioxidant status middels TAC (total antioxidant capacity) of voor het bepalen van biomarkers voor ontsteking zoals TPO (total peroxidase activity). Wanneer de analyse het toelaat zullen mestmonsters vanaf de vloer verzameld worden, waardoor rectale stimulatie niet nodig is. Wanneer het darmmicrobioom een rol speelt in het werkingsmechanisme, bijvoorbeeld bij probiotica, kan ook een rectale swab gebruikt worden om het darmmicrobioom te bepalen. Dit wordt meestal ingezet wanneer het darmmicrobioom over de tijd bepaald wordt in jonge biggen. Door mestmonsters of rectale swabs bij zeugen te nemen kunnen effecten van zeug op big bestudeerd worden.

### Weefsels, organen en lichaamsvloeistoffen na euthanasie

In iedere proef wordt een afweging gemaakt of en wanneer er monsters na euthanasie verzameld moeten worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

Dieren:	Biggen
Duur:	Gemiddeld 1 minuut
Wijze:	Volgens bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU
Moment:	Op één of twee momenten in de proef. Bij methode 1 t/m 4 kan het nodig zijn ook monsters te verzamelen vóór het spenen.

Onderbouwing: Dit kan noodzakelijk zijn om bijvoorbeeld de lokale immuunrespons in de darmwand (bijv. door middel van genexpressie), het microbioom in de darm, en darm morfologie en -integriteit te onderzoeken of de antioxidant status in organen.

### Overige bemonsteringen

In enkele proeven kan het voorkomen dat er ook speekselmonsters of tonsil swabs verzameld zullen worden bij zeugen en hun biggen.

#### Speekselmonster

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Wijze:	Door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes (swabs) of touwen

Onderbouwing: Speekselmonsters kunnen nodig zijn om het werkingsmechanisme van de voerstrategie te bestuderen. In het speeksel kunnen biomarkers voor de gezondheidsstatus, bijvoorbeeld antilichamen zoals sIgA, en biomarkers voor oxidatieve stress bepaald worden.

#### Tonsil swab

Dieren:	Zeugen en/of biggen
Duur:	Maximaal 3 minuten
Frequentie zeugen:	Maximaal 4 x per cyclus
Frequentie biggen:	Maximaal 6 x van geboorte tot 4 weken na spenen

Onderbouwing: Tonsil swabs kunnen in enkele gevallen, bijvoorbeeld bij onderzoek naar probiotica, ingezet worden om de relatie tussen de darm microbiota en tonsil microbiota te onderzoeken. Onderzoek van het microbioom van de tonsillen is daarom incidenteel informatief in dit type onderzoek.

### Referenties

Llamas Moya, S., Boyle, L., Lynch, P., Arkins, S. 2006. Pro-inflammatory cytokine and acute phase protein responses to low-dose lipopolysaccharide (LPS) challenge in pigs. *Animal Science* 82: 527–534.

5.1 lid2h

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste significante verschil (KSV). **Voor de powerberekeningen wordt een significant niveau van  $\alpha < 0,05$  en een power van 0,80 aangehouden. Bij de powerberekeningen worden de primaire uitkomstparameters gebruikt. In de LPS immuun competentie test zijn de primaire uitkomstparameters acute fase-eiwitten en cytokines.** Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in acute fase-eiwitten en cytokines. Het exacte aantal zeugen en (zogende) biggen is afhankelijk van de voerstrategie en de te meten uitkomstparameters en wordt berekend in een poweranalyse.



## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varken	2	Zeug	120	V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Alleen zogend	150	M/V	Nvt	Nvt
1	Varken	2	Big: Gespeend of zowel zoogperiode als gespeend	360	M/V	Nvt	Nvt

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Varken: onderzoek wordt uitgevoerd bij het doeldier.
Herkomst	2. Varkensstapel van <a href="#">5.1 lid2h</a> .
Levensstadia	In dit onderzoek worden zeugen (pariteit $\geq 1$ ) en hun nakomelingen ingezet. Effecten van voeding van zeugen, zogende biggen en gespeende biggen op de immuun-competentie bij gespeende biggen worden onderzocht. De biggen zullen worden gespeend op 28 dagen leeftijd, conform het besluit houders van dieren (91/630/EEG) en vergelijkbaar met de Nederlandse praktijk (Kengetallenspiegel van Agrovision, 2020).  <u>Referentie</u> AgroVision, 2020. Kengetallenspiegel. Kerngetallen Periode: januari -december 2019. Uitgave Maart 2020, Deventer.
Aantal	<u>Proeven waarbij zeugen ingezet worden (methode 1 en 2 in Tabel 1):</u> Gemiddeld 2 proeven x 6 behandelingen x (gemiddeld) 10 zeugen = 120 zeugen <u>Proeven waarbij biggen ingezet worden (methode 1 t/m 5 in Tabel 1):</u> In de LPS immuun competentie test zijn de primaire uitkomstparameters acute fase-eiwitten en cytokines. Uit onze eerdere powerberekeningen is gebleken tot 6-12 gespeende biggen per behandeling voldoende is om betrouwbare en, indien aanwezig, significante verschillen aan te tonen in acute fase-eiwitten en cytokines. Gemiddeld 1 proef per jaar x 6 behandelingen x (gemiddeld) 12 dieren = 72 biggen x 5 jaar = 360 biggen die (zowel voor als) na het spenen ingezet worden om de immuunrespons te volgen (matig ongerief). Vóór het spenen zullen 150 extra biggen ingezet worden om biggen te selecteren op basis van voldoende voeropname in de kraamstal of om het werkingsmechanisme van de voerstrategie vóór het spenen te bepalen (gering ongerief). In totaal worden 360 + 150 = 510 biggen ingezet.
Geslacht	Volwassen dieren (zeugen): vrouwelijk. Dit zijn de moederdieren van de biggen in dit onderzoek. Biggen: mannelijke en vrouwelijke dieren. Dit zijn de nakomelingen van de zeugen op het praktijkbedrijf.
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	n.v.t.

## C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Het is niet altijd mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De zeugen en biggen worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingmaterialen.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van 5.11.002H. In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten).

#### Referenties

- Kubasova T., Davidova-Gerzova L., Merlot E., et al. 2017. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One. 2017;12(1):e0170051.
- Wen, C., Woelders, H., Schokker, D., Kluijvers-Poodt, M., Rebel, J. M. J., van Dixhoorn, I. D. E., & Smidt, H. 2018. Effects of enriched pig housing on gut microbiome and immunology. Abstract from 14th International Symposium Digestive Physiology of Pigs, Brisbane, Australia 2018, Australia.
- Luo, L., Jansen, C.A.; Bolhuis, J.E.; Arts, J.A.J.; Kemp, B.; Parmentier, H.K. 2020. Early and later life environmental enrichment affect specific antibody responses and blood leukocyte subpopulations in pigs. Physiology & behavior: 112799.

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De biggen kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens het injecteren van LPS (of PBS) en tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### Referentie

National Centre for the replacement, refinement & reduction of animals in research (NC3Rs). Blood sample volumes. <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Korte termijn stress bij de varkens geassocieerd met hanteren in verband met de bemonsteringen (o.a. wegen, toedienen van injecties, bloedafname, rectale temperatuur). Ook fixatie (voor bloedmonsters) kan aversief zijn voor varkens.
- Verwacht wordt dat de dieren kortdurende milde tot matige ziekteverschijnselen zullen ontwikkelen na de LPS injecties, zoals een verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur op de dag van de LPS injectie (0.9-1.3°C verhoging t.o.v. negatieve controle met PBS injectie). Verwacht wordt dat deze klinische verschijnselen tot 4 uur na de LPS injectie aanhouden, waarna het dier herstelt en de voeropname weer op gang komt. We verwachten op basis van voorgaande proeven geen toename in medische behandelingen of uitval.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress geassocieerd met het hanteren kan optreden als gevolg van angst voor nieuwe situaties en angst voor het verlaten van hun vertrouwde hok (wegen).
- Activatie van het immuunsysteem als gevolg van de LPS injecties.

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

- Alle handelingen worden uitgevoerd door deskundig personeel dat geruime ervaring heeft met de verzorging en bemonstering van varkens. Handelingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrustmomenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat zeugen uit de varkensstapel van 5.1 lid2h worden gebruikt, zijn deze gewend aan de omgeving en het personeel, waardoor hanteren van de dieren tot minder onrust leidt.
- Alvorens de 1<sup>e</sup> LPS injectie toegediend zal worden aan gespeende biggen, vindt er eerst een adaptatieperiode plaats. Het spenen van biggen kan namelijk stressvol ervaren worden door de gelijktijdige veranderingen die optreden in voer en (sociale) omgeving. Door een adaptatieperiode in te lassen, vindt het toedienen van LPS plaats op een moment welke minder stressvol is voor de biggen. Hierdoor wordt het risico op ongerief beperkt. Bovendien is dit ook noodzakelijk voor de proefopzet, omdat als de LPS immuun competentie test direct na spenen uitgevoerd zal worden, de resultaten meer variatie kunnen vertonen wegens individuele verschillen voor wat betreft stress geassocieerd met spenen tussen de dieren.
- We gebruiken een lage LPS dosering. Op basis van eerdere proeven verwachten we geen ernstige ziekteverschijnselen en geen toename in uitval en het aantal medisch behandelde dieren.

## E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In principe wordt er geen humaan eindpunt verwacht.

We verwachten milde tot matige klinische verschijnselen vanaf ongeveer 30 minuten na LPS injectie tot 4 uur na LPS injectie. De kortdurende milde tot matige klinische verschijnselen die we verwachten zijn verminderde activiteit, verminderde voeropname, een lagere mestconsistentie, overmatig speekselvloed en/of een verhoogde lichaamstemperatuur. Hoewel er een lage dosering van LPS gebruikt wordt, kan er niet volledig worden uitgesloten dat de biggen ziekteverschijnselen gerelateerd aan LPS ontwikkelen die ernstiger of langduriger zijn dan verwacht. Om de gezondheid van de biggen na de LPS injectie daarom goed te controleren wordt de rectale temperatuur van de biggen gemeten op de dag van (meermaal per dag wanneer het dier klinische symptomen vertoont) en de dag na de LPS injectie en worden de biggen driemaal binnen 24u na de LPS injectie gecontroleerd op klinische verschijnselen.

Milde tot matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging :

- Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")
- Verminderde voeropname
- Rectale temperatuur >40.5°C
- (Waterdunne) Diarree
- Speekselen

Bij 2 waarnemingen van een rectale temperatuur >41°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander mild tot matig symptoom van toepassing is. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben (>40.5°C) en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.

Ernstige symptomen:

- Big is niet aan te sporen tot eten en drinken
- Wanneer de big niet wil opstaan, plat blijft liggen

De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.

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

0-1 %

## **F. Classificatie van ongerief**

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief van de LPS injecties (gevolgd door immuun activatie), van de bemonsteringen en in sommige proeven van euthanasie is matig voor de gespeende biggen (57% van de dieren). Het ongerief is licht voor de biggen met de PBS injecties (dieren in de controle behandeling). Het ongerief van de bemonsteringen is licht voor de zeugen en voor de biggen die alleen ingezet worden tijdens de zoogperiode (43% van de dieren). Het ontbreken van eetbare hokverrijking is in de ongeriefsclassificatie meegenomen.

## **G. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Om uitspraken te doen over het effect van voer(productie)strategieën en voeradditieven bij zeugen en hun biggen op de immuun competentie van gespeende biggen is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door ziekteverwekkers. Het afweersysteem van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of <i>in vitro</i> onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben, welke een belangrijke rol spelen in de immuun competentie. In <i>in vitro</i> onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen <i>in vitro</i> studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere afweerreactie van biggen niet vervangen.
Vermindering	De onderzoeksofzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op 5.1 lid2h en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.
Verfijning	De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via <i>E. coli</i> bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. **Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD.** Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.: Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

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

### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Zeugen en biggen die tot spenen gevolgd worden blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Euthanasie zal naar schatting plaatsvinden in 60% van de ingezette biggen na het spenen, en daarom naar schatting worden uitgevoerd in maximaal 216 biggen over 5 jaar (60% van 360). Het euthanaseren zal, bij onderzoeksvragen naar het werkingsmechanisme van de strategieën, bijdragen aan de interpretatie van de resultaten. Op basis van de beschikbare informatie over de strategieën zal worden bepaald of een subset van de varkens geëuthanaseerd zal worden in het kader van de proef, bijvoorbeeld om de concentratie van antioxidanten in lever en spieren te beoordelen, of de lokale immuunrespons in de darmwand en darmmorfologie en -integriteit te onderzoeken.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Sedatie gevolgd door euthanasie m.b.v. een euthasaat.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.

Naam van het project	Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-391184 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	varken gezondheid voer afweersysteem infectie
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren

## DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Jonge biggen zijn zeer gevoelig voor ziekte. Met name diarree door E. coli bacteriën en ontstekingen door Streptokokken bacteriën komen bij biggen regelmatig voor. Vooral in de periode rondom het spenen is het belangrijk om de gezondheid van de big extra te ondersteunen. Daarnaast kan de gezondheid en weerbaarheid van biggen verbeterd worden door de gezondheid van de zeug rondom de geboorte van haar biggen te optimaliseren. Het afweersysteem van biggen is namelijk na geboorte nog volop in ontwikkeling en onder andere de melk van de zeug speelt een grote rol in de afweer van de biggen. In dit project worden daarom voerstrategieën bij zeugen en hun biggen getest om de algemene weerstand van de biggen te verbeteren en om de weerbaarheid van biggen tegen met name de genoemde infectieuze ziekten te ondersteunen. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan voerstrategieën die de populatie van darmbacteriën positief beïnvloeden zodat ziekteverwekkers minder de kans krijgen om ziekte te veroorzaken. Door gespeende biggen bloot te stellen aan een milde vorm van één van deze ziekteverwekkers kan het effect van verschillende voerstrategieën op de gezondheid en weerstand van de biggen vastgesteld worden aan de hand van mestmonsters, bloedmonsters, swabs van keelamandelen en soms darminhoud en weefsel.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	De directe doelstelling is het ontwikkelen van voerstrategieën die de gezondheid ondersteunen bij specifieke ziekteverwerkers of die de algemene gezondheid / weerstand van biggen bevorderen. Door met voeding te sturen, wordt op deze wijze de kans dat varkens ziek worden kleiner. Daardoor wordt diergezondheid en dierenwelzijn verbeterd. Het uiteindelijke doel is verlaging van het gebruik van antibiotica en mineralen (welke nu in hoge doseringen worden ingezet om bacteriën te remmen). Hiermee wordt de volksgezondheid en de bodem- en waterkwaliteit bevorderd.



## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Om effecten op gezondheid bij specifieke ziekteverwekkers of de algemene gezondheid van gespeende biggen te testen, zullen de dieren eenmalig een milde vorm van de ziekteverwekker toegediend krijgen (oraal en soms gelijktijdig ook nasaal) of zal het afweersysteem geactiveerd worden door middel van injectie met een stofje dat ook bij ontstekingsreacties kan vrijkomen. Daarnaast zullen zeugen en biggen bemonsterd worden door het nemen van bloedmonsters (max. 10 x), mestmonsters (max. 15 x) of swabs van de keelamandelen (max. 12 x). Zo kan de reactie van de biggen voor wat betreft de activatie van het afweersysteem en de vermeerdering van de ziekteverwekker worden onderzocht bij verschillende voerstrategieën. De handelingen duren maximaal 5 minuten.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Na toediening van de (milde) ziekteverwekker of activatie van het afweersysteem kunnen de gespeende varkens zich in algemene zin ziek voelen gedurende een beperkte periode (uren tot een paar dagen). Ze zijn dan minder actief (wel alert) en eten minder en ze kunnen koorts of diarree krijgen. Het nemen van swabs (rectaal, van de keelamandelen of neus en bij de zeugen soms ook uit de vagina) en mestmonsters zal hooguit lichte stress opleveren bij de zeugen en biggen. Het afnemen van bloedmonsters kan kortdurend lichte pijn en stress opleveren. In proeven waarin de bacteriegroei van E. coli wordt gevolgd, zal een deel van de biggen antibiotica krijgen via het drinkwater om reeds aanwezige E. coli bacteriën voorafgaand aan de besmetting te verminderen. In proeven waarin de bacteriegroei van Streptokokken wordt gevolgd, zullen biggen verplaatst worden naar een andere stal op hetzelfde bedrijfsterrein en gehergroepeerd worden om een gestandaardiseerd moment van lichte stress te veroorzaken en zo een Streptokokken infectie op een voorspelbare manier te laten aanslaan. Een deel van de ingezette biggen wordt na de proef gedood om bijvoorbeeld effecten op bacteriegroei in darminhoud te kunnen onderzoeken.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>3090</td> <td>0</td> <td>1230</td> <td>1860</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	3090	0	1230	1860	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	3090	0	1230	1860	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>480</td> <td>894</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	480	894	0					
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	480	894	0														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Ruim de helft van de ingezette dieren wordt gedood in het kader van de proef. Dit zijn biggen waarvan de effecten op organen en de bacteriegroei in darminhoud en weefsels worden onderzocht of waarbij moet worden voorkomen dat zij de ingezette ziekteverwekker overdragen naar de andere dieren op het bedrijf. De zeugen, en ook biggen die bemonsterd maar niet besmet worden, blijven na de proef in leven en worden ingezet in het reguliere varkensbedrijf waar zij gehouden worden. Zeugen krijgen meerdere keren biggen in hun leven en kunnen daarom later opnieuw in onderzoek worden ingezet.</p>																



## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De voerstrategieën die in het project worden getest, zijn in een eerdere fase in het laboratorium getest (bijv. door middel van stimulatie van immuun- of darmwandcellen van varkens), met een positief resultaat. De laatste stap is om deze supplementen te testen bij de varkens zelf. Omdat het lichaam van een varken een complex systeem is, is het niet precies te voorspellen of de effecten die gevonden zijn in het laboratorium ook daadwerkelijk hetzelfde zijn bij het dier. Daarnaast kan het immuunsysteem leren van eerdere infecties, waardoor effecten in de tijd kunnen veranderen. Dit proces kan alleen in het dier zelf gevolgd worden.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Het benodigde aantal dieren wordt met statistische modellen berekend en hierdoor wordt gewerkt met het minimaal benodigde aantal dieren. Wanneer meerdere genomen monsters van 1 dier met elkaar vergeleken kunnen worden, en het dier daardoor zijn eigen controle kan vormen, zal dit worden gedaan. Op deze manier kan het aantal bemonsteringen en/of aantal dieren verminderd worden.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Er wordt een milde vorm van de ziekteverwekker gebruikt, die zorgvuldig geselecteerd en getest is in de afgelopen jaren, of een lage dosering van het stofje dat het immuunsysteem activeert. Hierbij kan de vermeerdering van de ziekteverwekker of de activatie van het afweersysteem gevolgd worden met behulp van bemonsteringen en waarnemingen, maar met zo min mogelijk ziekteverschijnselen. Na blootstelling aan de (milde) ziekteverwekker of activatie van het immuunsysteem worden de gespeende biggen nauwlettend gecontroleerd op ziekteverschijnselen en lichaamstemperatuur. In het uitzonderlijke geval dat dieren een reactie geven die langduriger of ernstiger is dan verwacht worden zij uit de proef gehaald. Indien de dieren aan het einde van de proef gedood worden, zullen bloedmonsters op die dag na de dood genomen worden.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij gespeende biggen is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door ziekteverwekkers. Het afweersysteem van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloed worden, waardoor het ook zeer zinvol is om voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

**Van:** 5.1 lid2h  
**Verzonden:** vrijdag 4 juni 2021 09:48  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588

Dag 5.1 lid2e

Dank voor je reactie. Goed om zo even mee te lezen in de overwegingen. 5.2 lid1

Ik zal dit ook delen met de DEC-leden, al doende leert men.

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e Namens Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 3 juni 2021 14:23  
**Aan:** 5.1 lid2h ; Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588

Beste 5.1 lid2e

Ik zou nog even terugkomen op de vraag of de aanvraag mogelijk beter als 'niet toetsbaar' teruggegeven had kunnen worden.

Laat ik voorop stellen dat de inschatting hiervan wat ons betreft geheel bij de DEC's ligt, wij beoordelen de aanvraag immers pas op een later stadium. De vuistregel die wij hanteren is dat er in principe binnen 1 vragenronde een toetsbaar geheel moet kunnen liggen voor de DEC beoordeling. Zowel de CCD als de DEC moeten binnen de wettelijke termijn van 40 werkdagen de aanvraag kunnen beoordelen, de aanvrager heeft hierin ook een verantwoordelijkheid en dient een voldoende kwalitatieve aanvraag in te dienen.

Wat betreft de huidige aanvraag 5.2 lid1

Ik hoop dat deze informatie enigszins helpt bij een eventuele volgeden afweging. Mochten er nog vragen zijn, dan hoor ik het uiteraard graag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2h  
**Verzonden:** dinsdag 18 mei 2021 10:01  
**Aan:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Onderwerp:** RE: Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588

Dag 5.1 lid2e

Fijn om te horen, alvast bedankt voor je moeite.

Hartelijke groet,  
5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e **Namens** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 17 mei 2021 14:56  
**Aan:** 5.1 lid2h ; 'info@zbo-ccd.nl'  
**Onderwerp:** RE: Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588

Beste 5.1 lid2e

Ik zal deze aanvraag komende week gaan behandelen. Zodra ik er inhoudelijk naar gekeken heb kom ik terug op je vraag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

**Namens de Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800-789 0789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** DEC 5.1 lid2h  
**Verzonden:** vrijdag 14 mei 2021 14:07  
**Aan:** 'info@zbo-ccd.nl' <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Onderwerp:** Advies 5.1 lid2h AVD 5.1 lid2h 202114588

Goedemiddag,

In de bijlage vindt u het advies van 5.1 lid2h voor projectaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588, inclusief de bijgewerkte documenten van de aanvraag.

Verder heb ik een vraag meer procedurele aard hierbij: we hebben na de eerste bespreking van deze aanvraag behoorlijk gewikt en gewogen: gingen we (heel veel) vragen stellen aan de onderzoeker, of zouden we de aanvraag direct aan jullie teruggeven als 'niet beoordeelbaar' vanwege het grote aantal onduidelijkheden? We hebben uiteindelijk voor de eerste optie gekozen. Ik ben als secretaris benieuwd hoe de CCD hier naar kijkt; kunnen jullie je vinden in de gekozen werkwijze, of zouden jullie adviseren een volgende keer de vragen niet aan de onderzoeker te stellen maar de aanvraag terug te geven aan de CCD als 'niet beoordeelbaar', met vermelding van de knelpunten?

Ik hoor graag hoe hier 'aan jullie kant' over gedacht wordt, uiteraard ben ik ook meer dan bereid hier eens met een van jullie over te spreken, mocht een schriftelijke reactie lastig zijn.

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Geachte leden van de CCD,

Op 03-06-2021 heeft de DEC van u een verzoek ontvangen om enkele onduidelijkheden in het door de DEC uitgebrachte advies nader toe te lichten. Het betreft het advies over het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h. Hieronder zijn uw opmerkingen steeds in cursief vermeld, met daaronder de reactie van de DEC daarop.

*Uw conclusie onder C9. is niet geheel navolgbaar. U geeft aan dat de afwijking van de Wod voldoende onderbouwd acht, maar geeft geen toelichting bij deze conclusie. Kunt u verder toelichten waarop u uw conclusie gebaseerd heeft?*

- Niet gefokt voor dierproeven: het betreft 5.1 lid2h voor de praktijk. Om resultaten te vertalen naar de praktijk betreft het een gesloten bedrijf met eigen fok- en afmest van landbouwhuisdieren, die onder praktijkomstandigheden worden gehouden. Voor de DEC is het navolgbaar dat deze dieren niet speciaal worden gefokt voor dierproeven, maar uit de eigen populatie worden gehaald op het moment dat er een dierproef wordt uitgevoerd. Vaak blijven de dieren ook binnen de populatie tijdens de dierproef en worden ze voor metingen tijdelijk geïsoleerd.
- Hergebruik: het hergebruik is voor de DEC navolgbaar omdat de dieren voor een groot deel in leven blijven en dan weer in de normale bedrijfsvoering worden opgenomen en zodoende weer in volgende proeven gebruikt kunnen worden. Het gaat in deze proef vooral ook om de zeugen, waar metingen aan worden verricht met licht ongerief. Deze zeugen worden weer ingezet in de fok, nadat de biggen gespeend zijn.

*Kunt u een toelichting geven bij uw conclusie onder C10. Met name met betrekking tot het huisvesten van zeugen in kraamhokken die niet voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. Op basis van de stukken is namelijk niet te achterhalen op basis van welke argumenten de aanvrager voor deze vorm van huisvesting heeft gekozen. Ook blijkt uit het antwoord onder J. onder A9 dat binnen afzienbare tijd een diervriendelijker alternatief beschikbaar zal komen.*

De afwijkende huisvesting betrof ontbreken van hokverrijking en oppervlaktemaat van het kraamhok, met name het ingesloten worden van de kraamzeug, wat door de DEC als extra ongerief wordt gezien vanwege ontbreken van loopruimte. De onderzoeker heeft hierop de volgende toelichting gegeven.

- Hokverrijking: de biggen krijgen geen eetbare hokverrijking omdat dit conflicteert met de opbouw van het immuunsysteem met name het darmmicrobioom dat daardoor beïnvloed kan worden en risico op overdracht van infecties via eetbare hokverrijking. Men heeft gekozen om niet-eetbare hokverrijking aan te bieden aan de biggen. Voor de zeug zal de laatste week voor werpen een jute zak worden aangeboden om tegemoet te komen aan het nestgedrag, wat ook als hokverrijking gezien kan worden.
- Oppervlaktemaat kraamhok en insluiten van de zeug in de kraamperiode tot spenen: onderzoeker geeft aan dat wel wordt voldaan aan de praktijknorm. De DEC heeft dit keer op keer aangegeven bij 5.1 lid2h dat dit onvoldoende is voor de Wod, maar nu zit er eindelijk beweging in. De onderzoeker geeft aan dat de kraamstal gerenoveerd wordt op dit moment en dat er vrijloopssystemen voor zeugen worden geplaatst, waarbij zowel aan oppervlaktenorm als aan beweging van de zeug tegemoet wordt gekomen in de kraamperiode. Nog in 2021 zal de renovatie afgerond worden. Het onderzoek dat nu gaat starten zal dan in deze

5.1 lid2h

DATUM

10 juni 2021

ONDERWERP

Aanvulling op advies 5.1 lid2h  
AVD 5.1 lid2h 202124588

POSTADRES

5.1 lid2h

INTERNET

5.1 lid2h

CONTACTPERSOON

5.1 lid2e

TELEFOON

5.1 lid2e

E-MAIL

5.1 lid2h

nieuwe kraamhokken worden uitgevoerd die in alle opzichten gaan voldoen aan de eisen die de Wod eraan stelt.

Met het antwoord dat de onderzoeker op deze vraag heeft gegeven, geeft de DEC het advies aan de CCD om goedkeuring te geven voor de kraamhokken die niet voldoet aan de Wod norm, voor nog een korte periode tot eind 2021.

*In uw schade baten analyse geeft u aan te twijfelen aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten van het project. U geeft echter geen toelichting over de oorsprong van deze twijfels.*

*De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid 2h . De opbrengsten van dit project zouden daarom indicatief moeten zijn voor de huidige aanvraag. bent u bekend met de opbrengsten van AVD 5.1 lid 2h en kunt u toelichten waarom u twijfelt aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten?*

De DEC is niet bekend met de opbrengsten van het voorgaande project. Hieronder een opsomming van de punten die aan de twijfels omtrent gezondheids-/welzijnseffecten van het project ten grondslag lagen:

1. De twijfels die de DEC heeft zitten met name in de gekozen aanpak. Streptokokkeninfecties vormen een bekend probleem in de varkenshouderij. Ziekteverschijnselen bij biggen treden vanaf ca. 10 dagen na spenen op, omdat tijdens de zoogperiode moedermelk kolonisatie van streptokokken onderdrukt. De echt grote winst om klinische streptokokkeninfecties te voorkomen zit meer in het geleidelijk spenen van biggen en niet op te vroege leeftijd.
2. Discussie in de DEC over de overdracht van streptokokken van de zeug naar de big. Streptokokken kunnen al tijdens de geboorte (via de geboorteweg) overgedragen worden aan de biggen. Vervolgens maken streptokokken geleidelijk deel uit van het oraal microbioom of enteraal microbioom en hierover wordt niets toegelicht door de onderzoeker. Uit de geleverde literatuur wordt niet duidelijk welke kennis van het orale en enterale microbioom van het jonge varken al voorhanden is en wat dit project daaraan zal toevoegen.
3. Het viel de DEC op dat er gebrek was aan focus. Door voeding is het microbioom te beïnvloeden, daar is geen geforceerde infectie (infectieproef) voor nodig. In het project worden biggen overgelegd van de ene naar de andere zeug en er wordt antibiotica toegediend. Deze beide interventies verstoren het microbioom. Wanneer er antibiotica aan een dragende zeug wordt toegediend, heeft dit invloed op het microbioom van zowel de zeug als de biggen die later geboren worden.
4. De DEC heeft twijfels of het gekozen model geschikt is om een gezondheids/welzijnsclaim aan te tonen. De DEC is wel van mening dat er een verschuiving kan plaatsvinden van het darmmicrobiom d.m.v. voeding, waardoor mogelijk een verminderd risico op kolonisatie ontstaat, maar is er niet van overtuigd dat dit zal bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. De verschillende addities die de onderzoeker wil testen zullen best een verschuiving in het microbiom teweeg brengen, maar hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren vormen tevens dominante risico's op het ontstaan van ziekte. In experimenten waar deze risico's als representatief voor de gangbare situatie "in het veld" worden geadresseerd, impliceert niet alleen een acceptatie van de huidige intensieve veehouderij, maar zet ook in op verdere intensivering.
5. Het is voor de DEC niet helder wat de bijdrage zal zijn van een infectieproef aan het vinden van een antwoord op de onderzoeksvraag. De onderzoeker heeft de DEC niet kunnen overtuigen van de relevantie hiervan.

*Het bovenstaande punt aangaande de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten raakt ook aan de mogelijke gevolgen voor de haalbaarheid van (een deel van) de doelstellingen. Daarmee lijkt uw twijfel onder punt 2 van de ethische afweging strijdig met uw conclusie onder C8. Kunt u toelichten hoe de antwoorden van de aanvrager uw initiële twijfels, zoals beschreven onder C8, hebben weggenomen en of u verwacht dat de doelstelling omtrent de beoogde gezondheids-/welzijnseffecten realistisch en haalbaar zijn?*

De DEC acht dit een terecht punt. C8 geeft aan dat er vele vragen zijn gesteld aan de onderzoeker, op een deel van de vragen is een antwoord gekomen dat voor de DEC navolgbaar is. Maar het blijft voor de DEC heel lastig om dit soort koepelaanvragen te beoordelen, waarin vage onderzoeksvraagstellingen worden geformuleerd en veel tekst en literatuur als achtergrondinformatie wordt aangevoerd waarvan de relevantie voor de onderzoeksvraagstelling niet is aangetoond. De DEC was ook verdeeld of dit project direct als 'onbeoordeelbaar' terug gestuurd zou moeten worden naar de CCD of dat we toch een serie vragen zouden formuleren voor de onderzoeker om wat meer helderheid en structuur te brengen in het geheel. Voor de laatste optie is gekozen. De DEC moet vanwege de doorlooptijd het aantal vragenrondes tot één beperken. De DEC is er zich van bewust dat het advies aan de CCD daarom ook nog verre van strak geformuleerd is.\

*De schade baten analyse onder D is niet geheel navolgbaar. Op basis van punt 2 onder D. Ethische Afweging lijkt uw schade baten analyse negatief uit te vallen. U kent immers een substantieel belang met hoge morele waarde toe aan de proefdieren, tegenover een reëel belang van beperkte morele waarde voor de onderzoekers. Daarbij geeft u aan te twijfels te hebben bij de gezondheids-/welzijnsopbrengsten voor de doeldieren. Kunt u toelichten hoe u uiteindelijk tot een positieve beantwoording van de centrale morele vraag heeft geleid?*

Ook hier was de DEC verdeeld. Dat een deel van de DEC akkoord is gegaan met een positief advies naar de CCD komt omdat dit type projecten (praktijkproeven) jarenlang van positieve adviezen is voorzien, omdat er maximaal sprake was van licht ongerief. Ook de huisvesting is elke keer een punt van discussie, en wordt ook zodanig aan de CCD gemeld, maar ook de CCD geeft steeds goedkeuring om in stallen die volgens praktijknorm zijn ingericht de proeven te mogen uitvoeren. Omdat nu de kraamafdeling wordt aangepast naar de Wod norm voor huisvesting vond de DEC dat op dit punt de onvolledige norm nog wel toelaatbaar was voor de komende maanden.

Er treedt nu echter een verschuiving op, omdat de 5.1 lid2h infectieproeven gaan uitvoeren, waardoor het ongerief verschuift van licht naar matig. Voor sommige DEC leden wordt hiermee een grens overschreden, omdat de huisvesting vaak niet helemaal op Wod is ingericht en omdat de kennis om goede infectieproeven uit te voeren minimaal aanwezig is. Corebusiness voor 5.1 lid2h is voederonderzoek en volgens sommige DEC leden lijkt het door het toevoegen van infectieproeven PR motieven mogelijk meer prevaleren dan wetenschappelijke motieven.

*Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het is, in het kader van transparantie, belangrijk om naast de weergave van argumenten voor het meerderheidsstandpunt ook de argumenten voor het minderheidsstandpunt weer te geven in het advies. Wij willen u daarom vragen om het minderheidsstandpunt te specificeren op niveau van verschillende belanghebbenden van het project en de waarden die in het geding zijn voor elk van de belanghebbenden.*

De argumenten voor het minderheidsstandpunt kunnen als volgt worden samengevat: In het verleden gingen de voederproeven gepaard met ten hoogste licht ongerief, nu worden infectieproeven als interventie aan de voederproeven toegevoegd in een black box benadering, waarvoor de rationale ontbreekt. Voor de vrij algemeen voorkomende infecties met *Streptococcus suis* en *Escherichia coli* kunnen processen zoals kolonisatie,



expressie van virulentiefactoren en translocatie worden onderscheiden. Omdat beide agentia algemeen voorkomen in varkenspopulaties kan de invloed van voeding op kolonisatie bij dieren op mucosaal niveau worden bestudeerd en zijn voldoende mogelijkheden beschikbaar om dergelijk onderzoek uit te voeren. Een extra interventie, zoals voorgesteld door infectieproeven, is een confounder in het voorkomende natuurlijke kolonisatieproces en ontwikkeling van oraal/enteraal microbiom. Het effect van voeding op expressie van virulentiefactoren, in casu quorum sensing spelen zeer wel mogelijk een belangrijke rol bij het ontwikkelen van pathologische processen zoals weefschade en/of translocatie. In het voorgestelde project kan geen onderscheid gemaakt worden in deze afzonderlijke processen en het leidt daarom niet tot vermeerdering van kennis maar alleen tot verhoging van ongerief. Een meer logische en voor de dieren minder belastende benadering zou een niet invasief onderzoek zijn waarbij de invloed van voeding en voedingscomponenten op de kwantitatieve aanwezigheid van beide bacteriën is in het orale/enterale microbiom. In aanvulling op de infectieproeven is de rationale voor het uitvoeren en interpreteren van LPS-immuun-competentie-experimenten onduidelijk.

*Het project richt zich op voer(productie)strategieën en/of additieven de voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom dierproeven ten behoeve van de veehouderij geldt daarmee ook voor dit project. Kunt u toelichten hoe u tegen dit dilemma aankijkt?*

Het onderzoek moet inderdaad passen binnen de richtlijn die door de RDA wordt aangegeven wat betreft onderzoek naar intensieve veehouderij. Voor dit project ziet de DEC een ethisch dilemma bij het gebruik van proefdieren t.b.v. voederinterventies t.a.v. de huidige veehouderij. De belangrijke aandoeningen waar dit project over gaat, Streptococcus suis en E.coli veroorzaken beiden infecties die een ernstiger verloop hebben bij 'suboptimale' huisvesting, management en hygiëne. E.Coli en streptokokken zijn endemisch op alle varkensbedrijven in Nederland. Steeds meer zijn er ook initiatieven/innovaties op gebied van stalbouw, huisvesting en management en stemhygiëne die een substantiële bijdrage leveren aan het voorkomen van klinische symptomen t.a.v. genoemde kiemen, waardoor het welzijn en gezondheid van de dieren verbetert. Deze innovaties vragen wel vaak minder dieren per unit, meer stalverrijking waardoor dieren beter aan hun natuurlijke behoeftes/gedrag kunnen voldoen. Dergelijke inspanningen geven geen directe verbetering van het rendement en hebben een beperkte prioriteit. Goede voeding is heel belangrijk voor de gezondheid van het dier, maar of infectieproeven, die gedaan worden om kleine niet-relevante verschillen te vinden tussen de verschillende voeders/additieven zullen bijdragen aan een transitie naar een duurzame veehouderij is naar de mening van de DEC zeer twijfelachtig.

De DEC hoopt hiermee uw vragen naar behoren te hebben beantwoord.  
We zien de terugkoppeling van uw uiteindelijke beslissing graag tegemoet.

Hartelijke groet, namens de DEC,

5.1 lid2e  
Secretaris 5.1 lid2h

---

**Van:** 5.1 lid2e )  
**Verzonden:** vrijdag 11 juni 2021 15:59  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** RE: aanvullend dec advies AVD202114588

Als ik dit zo lees 5.2 lid1  
Voor de DEC zat het zo te  
lezen ook vol met dilemma's.

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen  
Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0800 7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** vrijdag 11 juni 2021 15:49  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** aanvullend dec advies AVD202114588

5.2 lid1

---

**Van:** 5.1 lid2e )  
**Verzonden:** dinsdag 15 juni 2021 17:50  
**Aan:** 5.1 lid2e )  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Thanks!

Ik had met 5.1 lid2e ongeveer hetzelfde idee. 5.2 lid1

Groet!

5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** dinsdag 15 juni 2021 16:57  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Hoi 5.1 lid2e  
5.2 lid1

Gr. 5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** maandag 14 juni 2021 17:41  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Hoi 5.1 lid2e ,

Kunnen jullie mijn 2<sup>e</sup> vragenronde voor de DEC (zie hieronder) voor mij tegenlezen en aangeven wat jullie ervan vinden? Is het duidelijk wat mijn vraag is en ben ik niet te direct?

Alvast bedankt!

5.1 lid2e

Beste 5.1 lid2e/DEC 5.1 lid2h

Bedankt voor het aanvullende advies. Dit heeft een aantal onduidelijkheden weggengomen, met name ten aanzien van uw conclusies inde C9 en C10. Uw overwegingen voornamelijk uw bedenkingen bij de opbrengsten van het project, de relevantie/opzet van de proeven (3V's) en de haalbaarheid van de gezondheidsdoelstellingen hebben bij

ons echter nieuwe vragen opgeroepen. Met **name** hoe deze bedenkings aansluiten bij uw initiële/**uiteindelijke** positieve advies.

### **Opzet van de proeven en haalbaarheid doelstelling**

Onder punt 3 op pagina 2 geeft u aan te twifelen aan de opzet van de proeven, doordat het overleggen van de biggen en het toedienen van antibiotica een versturende werking op het microbiom hebben. Ook geeft u op pagina 3 aan dat er bij u twijfels leven over de aanwezige expertise op het gebied van infectieproeven.

**Dit zijn zorgwekkende punten.** Een gebrek aan kennis en kunde bij de aanvrager kan ertoe leiden dat dieren onnodig worden ingezet in onnodige en belastende experimenten.

### **Opbrengsten**

**U geeft Zo geeft u** op pagina 2 onder punt 2 aan dat niet duidelijk is wat het project zal toevoegen aan de bestaande kennis van het orale en enterale microbiom. Ook schrijft u onder punt 4 op pagina 2 **staat** dat u twijfels heeft **bij of** het gekozen model wel geschikt is om een gezondheids/welzijnsclaim aan te tonen en mogelijk het tegenovergestelde in de hand **kan kunnen** werken in de vorm van een verdere intensivering van de veehouderij.

In uw originele advies onderkent u de volgende mogelijke opbrengsten voor de belanghebbenden:

- 1) De doeldieren: nieuwe kennis zou kunnen leiden tot gezondheidswinst.
- 2) De onderzoekers: wetenschappelijke kennis en waardering.
- 3) De veevoederfabrikanten: economisch belang.
- 4) Het milieu en de maatschappij: minder milieubelasting.

In het licht van uw bovenstaande twijfels is het onwaarschijnlijk dat het project leidt tot gezondheids/welzijnsverbetering voor de doeldieren (2), nieuwe wetenschappelijke kennis zal opleveren (3), of significante positieve effecten op het milieu zal hebben (4 5).

### **Relevantie van de proeven en 3V's**

Onder punt 3 op pagina 2 geeft u aan te twifelen aan de noodzaak van een geforceerde infectie om effecten van voeding op het microbiom aan te tonen. Onder punt 5 geeft u aan dat de onderzoeker u niet heeft kunnen overtuigen van de relevantie van een infectieproef voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag. Op pagina 3 geeft u aan dat het toevoegen van geforceerde infecties aan dit type praktijkproeven leidt tot een toename van het ongerief.

Hieruit concluderen wij dat **u vindt dat** infectieproeven **mogelijk** geen geschikte en niet de meest verfijnde methode zijn voor het behalen van de doelstelling. De Wod (Artikel 10, lid 2, sub c) schrijft voor dat indien er verschillende mogelijkheden bestaan om een dierproef te verrichten, de dierproef geselecteerd dient te worden die de dieren het minste pijn, lijden, angst of schade berokkent. Sterker, het is verboden om een dierproef uit te voeren als er een alternatief bestaat waarbij minder ongerief wordt berokkend (Wod, artikel 10, lid 1, sub a). Als u ervan overtuigd bent dat de geforceerde infectieproeven niet noodzakelijk en geschikt zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen, **is het voor ons niet helder hoe u ondanks uw bedenkingen bij deze proeven toch tot een positief advies komt kan dit in onze ogen niet leiden tot een positief advies.**

### **Veehouderijdilemma en ethische afweging**

Daarnaast haalt u in uw aanvullende advies het dilemma omtrent veehouderij aan. Op pagina 2 geeft u onder punt 1 aan dat streptokokkeninfecties rondom het spenen voornamelijk een gevolg zijn van de manier waarop de dieren **worden gehouden, en** dat het probleem te mitigeren is door het later en meer geleidelijke spenen van biggen. Onder punt 4 voegt u hieraan toe dat experimenten zoals in het huidige project worden voorgesteld een acceptatie van de huidige intensieve veehouderij impliceren en inzetten op verdere intensivering.

Het project lijkt zich dus te richten op bestrijden van een symptoom van de intensieve veehouderij en zal mogelijk kunnen bijdragen aan een **verdeer** intensivering. De CCD heeft vaak geworsteld met aanvragen voor de veehouderij en heeft de RDA gevraagd om een zienswijze. Op basis van deze RDA zienswijze 'Dierproeven ten behoeve van de Veehouderij' heeft de CCD een uitvoeringsbeleid vergunningsaanvragen veehouderij ontwikkeld en gepubliceerd op haar website (<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/documenten/formulieren/19/11/14/14>). Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, acht de CCD het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij<sup>4</sup> Aan een economisch belang kent de CCD om die reden een beperkt belang toe. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. De CCD vindt het van belang dat dierproeven ten behoeve van de veehouderij een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren. Symptoombestrijding of een economisch belang waardeert de CCD om die reden als een beperkt belang. De CCD vindt het bovendien voor aanvragen die enkel gericht zijn op symptoombestrijding van belang dat het ongerief dat de dieren ondergaan niet hoger is dan licht ongerief.

De CCD geeft geen richtlijn aan de DEC's hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden gewaardeerd en ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden. De DEC maakt haar eigen ethische afweging voor haar onafhankelijke advies. De CCD vraagt de DEC wel om aan te geven waarom zij van mening is dat bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (schade) voor de andere belanghebbende.

5.2 lid1

In het licht van de bovenstaande punten uit uw aanvullende advies, is het voor ons niet navolgbaar hoe u uiteindelijk tot een positief advies gekomen bent. Kunt u dit nader onderbouwen?

Met vriendelijke groet,

---

Van: 5.1 lid2h >

Verzonden: donderdag 10 juni 2021 12:49

Aan: Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Goedemiddag 5.1 lid2e

In de bijlage een brief van 5.1 lid2h, in reactie op jullie vragen n.a.v. het eerder uitgebrachte advies.

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

Van: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

Verzonden: donderdag 3 juni 2021 12:36

Aan: 5.1 lid2h

Onderwerp: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Geachte 5.1 lid2h,

Op 25-02-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114588.

Tijdens de behandeling van deze aanvraag stuitte wij op enkele onduidelijkheden waar wij graag aanvullend advies over zouden ontvangen.

Uw conclusie onder C9. is niet geheel navolgbaar. U geeft aan dat de afwijking van de Wod voldoende onderbouwd acht, maar geeft geen toelichting bij deze conclusie. Kunt u verder toelichten waarop u uw conclusie gebaseerd heeft?

Kunt u een toelichting geven bij uw conclusie onder C10. Met name met betrekking tot het huisvesten van zeugen in kraamhokken die niet voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. Op basis van de stukken is namelijk niet te achterhalen op basis van welke argumenten de aanvrager voor deze vorm van huisvesting heeft gekozen. Ook blijkt uit het antwoord onder J. onder A9 dat binnen afzienbare tijd een diervriendelijker alternatief beschikbaar zal komen.

In uw schade baten analyse geeft u aan te twijfelen aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten van het project. U geeft echter geen toelichting over de oorsprong van deze twijfels.

De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD **5.1 lid2h**. De opbrengsten van dit project zouden daarom indicatief moeten zijn voor de huidige aanvraag. bent u bekend met de opbrengsten van AVD **5.1 lid2h** en kunt u toelichten waarom u twijfelt aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten?

Het bovenstaande punt aangaande de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten raakt ook aan de de mogelijke gevolgen voor de haalbaarheid van (een deel van) de doelstellingen. Daarmee lijkt uw twijfel onder punt 2 van de ethische afweging strijdig met uw conclusie onder C8. Kunt u toelichten hoe de antwoorden van de aanvrager uw initiële twijfels, zoals beschreven onder C8, hebben weggenomen en of u verwacht dat de doelstelling omtrent de beoogde gezondheids-/welzijnseffecten realistisch en haalbaar zijn?

De schade baten analyse onder D is niet geheel navolgbaar. Op basis van punt 2 onder D. Ethische Afweging lijkt uw schade baten analyse negatief uit te vallen. U kent immers een substantieel belang met hoge morele waarde toe aan de proefdieren, tegenover een reëel belang van beperkte morele waarde voor de onderzoekers. Daarbij geeft u aan te twijfels te hebben bij de gezondheids-/welzijnsopbrengsten voor de doeldieren. Kunt u toelichten hoe u uiteindelijk tot een positieve beantwoording van de centrale morele vraag heeft geleid?

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het is, in het kader van transparantie, belangrijk om naast de weergave van argumenten voor het meerderheidsstandpunt ook de argumenten voor het minderheidsstandpunt weer te geven in het advies. Wij willen u daarom vragen om het minderheidsstandpunt te specificeren op niveau van verschillende belanghebbenden van het project en de waarden die in het geding zijn voor elk van de belanghebbenden.

Het project richt zich op voer(productie)strategieën en/of additieven de voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom dierproeven ten behoeve van de veehouderij geldt daarmee ook voor dit project. Kunt u toelichten hoe u tegen dit dilemma aankijkt?

Indien mogelijk zouden wij de aanvullende informatie graag voor vrijdag 11 juni ontvangen, zodat wij ons advies kunnen finaliseren voor de CCD vergadering van vrijdag 18 juni 2021. Wij horen graag of dit mogelijk is.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

**5.1 lid2e**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** woensdag 23 juni 2021 15:58  
**Aan:** 5.1 lid2e )  
**CC:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

**Opvolgingsvlag:** Opvolgen  
**Vlagstatus:** Voltooid

Geachte 5.1 lid2e /CCD,

Ik heb onderstaande vraag gelezen en het lijkt me in deze beter dat wij even met elkaar daar telefonisch over praten. Ik ben van mening dat alle antwoorden al gegeven zijn, maar misschien niet helemaal duidelijk zijn overgekomen. Om niet iedereen met extra werk op te zadelen lijkt me telefonisch de kortste route.

Zouden wij morgenmiddag donderdag 24-6 rond 15.00 uur met elkaar hier over kunnen bellen. Mijn telefoonnummer is: 5.1 lid2e

Vriendelijke groeten,  
5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2h  
**Verzonden:** woensdag 23 juni 2021 08:51  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** FW: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Dag 5.1 lid2e

Zie onder een bericht van de CCD, in reactie op bijgaande brief.  
Zou jij een antwoord kunnen formuleren?



Hartelijke groet,

5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e Namens Info-zbo

**Verzonden:** vrijdag 18 juni 2021 12:49

**Aan:** 5.1 lid2h Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Beste 5.1 lid2e / 5.1 lid2h

Bedankt voor het aanvullende advies. Dit heeft een aantal onduidelijkheden weggennomen, met name ten aanzien van uw conclusies inde C9 en C10. Op andere punten hebben de aanvullingen echter nieuwe vragen opgeroepen. Met name de bedenkingen die u heeft bij de opbrengsten van het project, opzet van de proeven en relevantie van bepaalde handelingen (3V's), aanwezige expertise bij de aanvrager, de haalbaarheid van de doelstellingen maken de uiteindelijke ethische afweging en het advies om de dierproef te vergunnen moeilijk navolgbaar. Kunt u toelichten hoe u uiteindelijk toch tot een positief advies bent gekomen?

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

**Namens de Centrale Commissie Dierproeven**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800-789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 5.1 lid2h

**Verzonden:** donderdag 10 juni 2021 12:49

**Aan:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Goedemiddag 5.1 lid2e

In de bijlage een brief van 5.1 lid2h, in reactie op jullie vragen n.a.v. het eerder uitgebrachte advies.

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

**Verzonden:** donderdag 3 juni 2021 12:36

**Aan:** 5.1 lid2h

**Onderwerp:** Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Geachte 5.1 lid2h,

Op 25-02-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114588.

Tijdens de behandeling van deze aanvraag stuiten wij op enkele onduidelijkheden waar wij graag aanvullend advies over zouden ontvangen.

Uw conclusie onder C9. is niet geheel navolgbaar. U geeft aan dat de afwijking van de Wod voldoende onderbouwd acht, maar geeft geen toelichting bij deze conclusie. Kunt u verder toelichten waarop u uw conclusie gebaseerd heeft?

Kunt u een toelichting geven bij uw conclusie onder C10. Met name met betrekking tot het huisvesten van zeugen in kraamhokken die niet voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. Op basis van de stukken is namelijk niet te achterhalen op basis van welke argumenten de aanvrager voor deze vorm van huisvesting heeft gekozen. Ook blijkt uit het antwoord onder J. onder A9 dat binnen afzienbare tijd een diervriendelijker alternatief beschikbaar zal komen.

In uw schade baten analyse geeft u aan te twijfelen aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten van het project. U geeft echter geen toelichting over de oorsprong van deze twijfels.

De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h. De opbrengsten van dit project zouden daarom indicatief moeten zijn voor de huidige aanvraag. bent u bekend met de opbrengsten van AVD 5.1 lid2h en kunt u toelichten waarom u twijfelt aan de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten?

Het bovenstaande punt aangaande de omvang van de gezondheids-/welzijnseffecten raakt ook aan de de mogelijke gevolgen voor de haalbaarheid van (een deel van) de doelstellingen. Daarmee lijkt uw twijfel onder punt 2 van de ethische afweging strijdig met uw conclusie onder C8. Kunt u toelichten hoe de antwoorden van de aanvrager uw initiële twijfels, zoals beschreven onder C8, hebben weggenomen en of u verwacht dat de doelstelling omtrent de beoogde gezondheids-/welzijnseffecten realistisch en haalbaar zijn?

De schade baten analyse onder D is niet geheel navolgbaar. Op basis van punt 2 onder D. Ethische Afweging lijkt uw schade baten analyse negatief uit te vallen. U kent immers een substantieel belang met hoge morele waarde toe aan de proefdieren, tegenover een reëel belang van beperkte morele waarde voor de onderzoekers. Daarbij geeft u aan te twijfelen te hebben bij de gezondheids-/welzijnsopbrengsten voor de doeldieren. Kunt u toelichten hoe u uiteindelijk tot een positieve beantwoording van de centrale morele vraag heeft geleid?

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het is, in het kader van transparantie, belangrijk om naast de weergave van argumenten voor het meerderheidsstandpunt ook de argumenten voor het minderheidsstandpunt weer te geven in het advies. Wij willen u daarom vragen om het minderheidsstandpunt te specificeren op niveau van verschillende belanghebbenden van het project en de waarden die in het geding zijn voor elk van de belanghebbenden.

Het project richt zich op voer(productie)strategieën en/of additieven de voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom dierproeven ten behoeve van de veehouderij geldt daarmee ook voor dit project. Kunt u toelichten hoe u tegen dit dilemma aankijkt?

Indien mogelijk zouden wij de aanvullende informatie graag voor vrijdag 11 juni ontvangen, zodat wij ons advies kunnen finaliseren voor de CCD vergadering van vrijdag 18 juni 2021. Wij horen graag of dit mogelijk is.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



# Advies aan CCD

## B

Datum 03 juli 2021  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114588

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.  
 Aanvraagnummer: AVD202114588  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

<p><b>Proces</b></p>	<p>Vragen gesteld aan aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Deze aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h. In het projectvoorstel wordt echter niet vermeld wat de opbrengsten van de proeven onder de voorgaande vergunning zijn geweest. Dit is echter relevante informatie voor het beoordelen van uw huidige projectaanvraag. Wij verzoeken u daarom om deze opbrengsten toe te voegen aan het projectvoorstel.</li> <li>- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?</li> <li>- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee minder leefruimte zullen hebben dan de minimaal voorgeschreven oppervlakte in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.</li> <li>- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is onvoldoende navolgbaar in de bijlagen. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten zodat uit de bijlagen blijkt hoe het aantal dieren tot stand komt.</li> <li>- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de</li> </ul>
----------------------	---

	<p>humane eindpunten in iedere bijlage concreter te formuleren, zodat duidelijk blijkt wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.</p> <p>Vragen NTS:</p> <p>- Wij verzoeken u om de NTS aan te vullen onder 'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren', zodat deze een volledig beeld geeft van de inhoud van het project. Dus hier graag ook vermelden dat sommige biggen antibiotica zullen krijgen toegediend en/of op transport gaan, zeugen vaginale swabs krijgen en een deel van de dieren gedood zal worden.</p> <p>- Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	Zeugen en biggen	1.440	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	Zeugen en biggen	1.020	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	Zeugen en biggen alleen zogend)	630	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

#### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn


3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

# Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD\_1\_5.1 lid2e.pdf

---

Pagina: 2

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Highlight    Datum: 3-7-2021 01:06:54

---

Status  
5.1 lid2e Geaccepteerd    3-7-2021 07:42:05

Citaat.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van 5.1 lid2h. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Citaat.

De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Het is niet altijd mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De zeugen en biggen worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingsmaterialen.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van het **5.1 lid2h**. In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten).

### **Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst**

#### **3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen**

Citaat.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### **3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen**

Zie 3.4.3.1.

#### **3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen**

Zie 3.4.3.1.



### **Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren**

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

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

#### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

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

#### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

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

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

### **2 DEC advies**

<b>DEC-advies</b>	<p>Initieel DEC advies:</p> <p>Citaat C9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) x Hergebruik (1e, lid 2) De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.</p> <p>Citaat C10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.</p> <p>Citaat A9, vraag j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.) Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op de immuuncompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit</p>
-------------------	--

het darmmicrobiom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli of S. suis bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.

Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.

\*zie ook het gehele aanvullende DEC advies  
'AVD202114588e2\_Aanvulling DECadvies'\*

\*\* Onder punt 5 op pagina 2 van het aanvullende DEC advies gaat de DEC in op de relevantie van de infectieproef. Zie hiervoor ook A9, vraag c. van het originele DEC advies waarin de DEC de aanvrager verzoekt om deze te onderbouwen.\*\*

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het



lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:

De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.

Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande preventie strategieën (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).

3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.

De argumenten voor het minderheidsstandpunt kunnen als volgt worden samengevat: In het verleden gingen de voederproeven gepaard met ten hoogste licht ongerief, nu worden infectieproeven als interventie aan de voederproeven toegevoegd in een black box benadering, waarvoor de rationale ontbreekt. Voor de vrij algemeen voorkomende infecties met *Streptococcus suis* en *Escherichia coli* kunnen processen zoals kolonisatie, expressie van virulentiefactoren en translocatie worden onderscheiden. Omdat beide agentia algemeen voorkomen in varkenspopulaties kan de invloed van voeding op kolonisatie bij dieren op mucosaal niveau worden bestudeerd en zijn voldoende mogelijkheden beschikbaar om dergelijk

onderzoek uit te voeren. Een extra interventie, zoals voorgesteld door infectieproeven, is een confounder in het voorkomende natuurlijke kolonisatieproces en ontwikkeling van oraal/enteraal microbiom. Het effect van voeding op expressie van virulentiefactoren, in casu quorum sensing spelen zeer wel mogelijk een belangrijke rol bij het ontwikkelen van pathologische processen zoals weefselschade en/of translocatie. In het voorgestelde project kan geen onderscheid gemaakt worden in deze afzonderlijke processen en het leidt daarom niet tot vermeerdering van kennis maar alleen tot verhoging van ongerief. Een meer logische en voor de dieren minder belastende benadering zou een niet invasief onderzoek zijn waarbij de invloed van voeding en voedingscomponenten op de kwantitatieve aanwezigheid van beide bacteriën is in het orale/enterale microbiom. In aanvulling op de infectieproeven is de rationale voor het uitvoeren en interpreteren van LPS-immuun-competentie-experimenten onduidelijk.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Huisvesting (initieel DEC advies).

Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.

Veehouderij dilemma (aanvullend DEC advies).

Het onderzoek moet inderdaad passen binnen de richtlijn die door de RDA wordt aangegeven wat betreft onderzoek naar intensieve veehouderij. Voor dit project ziet de DEC een ethisch dilemma bij het gebruik van proefdieren t.b.v. voederinterventies t.a.v. de huidige veehouderij. De belangrijke aandoeningen waar dit project over gaat, Streptococcus suis en E.coli veroorzaken beiden infecties die een ernstiger verloop hebben bij 'suboptimale' huisvesting, management en hygiëne. E.Coli en streptokokken zijn endemisch op alle varkensbedrijven in Nederland. Steeds meer zijn er ook initiatieven/innovaties op gebied van stalbouw, huisvesting en management en stemhygiëne die een substantiële bijdrage leveren aan het voorkomen van klinische symptomen t.a.v. genoemde kiemen, waardoor het welzijn en gezondheid van de dieren verbetert. Deze innovaties vragen wel vaak minder dieren per unit, meer stalverrijking waardoor dieren beter aan hun natuurlijke behoeftes/gedrag kunnen voldoen. Dergelijke inspanningen geven geen directe verbetering van het rendement en hebben een beperkte prioriteit. Goede voeding is heel belangrijk voor de gezondheid van het dier, maar

	of infectieproeven, die gedaan worden om kleine niet-relevante verschillen te vinden tussen de verschillende voeders/additieven zullen bijdragen aan een transitie naar een duurzame veehouderij is naar de mening van de DEC zeer twijfelachtig.
--	---

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. 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.
	<p>Uw initiële advies is moeilijk navolgbaar, omdat veel vragen gesteld zijn en de overwegingen die tot uw conclusies bij de beoordelingsvragen hebben geleid niet uit het advies naar voren komen. Ook de ethische afweging is vrij beknopt en het is niet goed navolgbaar hoe de beantwoording van de centrale morele vraag toe een positief oordeel geleid heeft. Wanneer er initieel twijfels zijn bij aspecten van een aanvraag is het voor ons zeer waardevol bij de beantwoording van de C vragen en centrale morele vraag inzicht te krijgen in de afwegingen die tot de uiteindelijke conclusie hebben geleid.</p> <p>Uw aanvullingen op het initiële advies hebben veel belangrijke additionele informatie gegeven die cruciaal is gebleken voor de beoordeling van het project. De inhoud van het aanvullende advies is in onze ogen niet in lijn met het positieve advies. Met name uw bedenkingen bij de gekozen strategie, relevantie van de infectieproef, haalbaarheid van de doelstellingen en opbrengsten lijken tegenstrijdig in het licht van het advies om het project te vergunnen. Ook was het advies gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Wij zijn daarom bij de beoordeling van het project uitgegaan van onze eigen ethische afweging op basis van de alle beschikbare informatie vanuit de aanvrager, het initiële DEC advies en het aanvullende DEC advies.</p> <p>Wij erkennen het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het blijkt echter problematisch om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per project verschillend is. Het standpunt van de CCD aangaande deze afwijkingen is nee-tenzij. Hierbij is van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is.</p>

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat.</p> <p>De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen.</p> <p>Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en E. coli en S. suis infecties te verminderen.</p> <p>Uiteindelijke doel: Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale <b>5.1 lid2h</b> <b>5.1 lid2h</b> Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.</p> <p>Hieronder vallen drie subdoelen: het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen</li><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen</li><li>• de immuun competentie van gespeende biggen</li></ul>
-------------------------------------	---

<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat. Wetenschappelijk belang Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbiom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.</p> <p>Maatschappelijk belang E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt.</p>
<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC initieel advies C7. Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij 5.1 lid2h acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.</p> <p>Citaat aanvullend DEC advies, pagina 2. (...) 3. Het viel de DEC op dat er gebrek was aan focus. Door voeding is het microbiom te beïnvloeden, daar is geen geforceerde infectie</p>



(infectieproef) voor nodig. In het project worden biggen overgelegd van de ene naar de andere zeug en er wordt antibiotica toegediend. Deze beide interventies verstoren het microbiom. Wanneer er antibiotica aan een dragende zeug wordt toegediend, heeft dit invloed op het microbiom van zowel de zeug als de biggen die later geboren worden.

4. De DEC heeft twijfels of het gekozen model geschikt is om een gezondheids/welzijnsclaim aan te tonen. De DEC is wel van mening dat er een verschuiving kan plaatsvinden van het darmmicrobiom d.m.v. voeding, waardoor mogelijk een verminderd risico op kolonisatie ontstaat, maar is er niet van overtuigd dat dit zal bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. De verschillende additieven die de onderzoeker wil testen zullen best een verschuiving in het microbiom teweeg brengen, maar hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren vormen tevens dominante risico's op het ontstaan van ziekte. In experimenten waar deze risico's als representatief voor de gangbare situatie "in het veld" worden geadresseerd, impliceert niet alleen een acceptatie van de huidige intensieve veehouderij, maar zet ook in op verdere intensivering.

5. Het is voor de DEC niet helder wat de bijdrage zal zijn van een infectieproef aan het vinden van een antwoord op de onderzoeksvraag. De onderzoeker heeft de DEC niet kunnen overtuigen van de relevantie hiervan.

Citaat aanvullend advies pagina 3, alinea 5.

Er treedt nu echter een verschuiving op, omdat de voederonderzoeksinstituten infectieproeven gaan uitvoeren, waardoor het ongerief verschuift van licht naar matig. Voor sommige DEC leden wordt hiermee een grens overschreden, omdat de huisvesting vaak niet helemaal op Wod is ingericht en omdat de kennis om goede infectieproeven uit te voeren minimaal aanwezig is. Corebusiness voor voedingsinstituten is voederonderzoek en volgens sommige DEC leden lijkt het door het toevoegen van infectieproeven PR motieven mogelijk meer prevaleren dan wetenschappelijke motieven.

## 5.2 lid 1

**3V's**

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of in vitro onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In in vitro onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen in vitro studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> zie 3.4.3.1.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op het onderzoeksinstituut en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op het onderzoeksinstituut en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1., additioneel:</p> <p>Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen.</p>

	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via E. coli bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken.</p> <p>Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
--	---

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
	<p>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen: Citaat.</p> <p>Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.</p>
	3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen: Zie 3.4.3.1.
	3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen: zie 3.4.3.1.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-2%	<p>Citaat. (...) Milde symptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Verminderde gewichtstoename</li> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> </ul> <p>Bij milde symptomen zonder dat één van de onderstaande matige of ernstige symptomen voor het maximale aantal waarnemingen optreedt zal het dier in de proef blijven.</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Matige uitdrogingsverschijnselen, zoals een rimpelige huid</li> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Big trilt en biggen liggen op/tegen elkaar</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts</li> <li>o Overgeven</li> </ul> <p>Bij het optreden van matige symptomen zal de huid turgor en slijmvliezen gecontroleerd worden. Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en</p>

		<p>ter sectie aangeboden.</p> <p>* Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40,5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan E. coli gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Rectale temperatuur <math>&lt; 39^{\circ}\text{C}</math></li> <li>o Ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor (huidplooi blijft staan) of diep ingevallen ogen</li> <li>o Afwijkende kleur van de slijmvliezen</li> <li>o Bloederige diarree</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 63,0% Matig 37,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-3%	<p>Citaat. (...)</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Rectale temperatuur <math>&gt; 40^{\circ}\text{C}</math> (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (<math>&gt; 50</math> per min.), meestal als gevolg van koorts.</li> <li>o Zichtbare kreupelheid aan 1 poot waarbij de gewrichten niet gezwollen zijn en het dier deze nog wil belasten</li> </ul> <p>Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>

		<p>*Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan <i>S. suis</i> gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Duidelijke symptomen van hersenverschijnselen die wijzen op meningitis, zoals</li> <li>o Evenwichtsstoornissen</li> <li>o Slechte coördinatie</li> <li>o Kopschudden,</li> <li>o Op 1 zijde liggen,</li> <li>o Snelle oogbewegingen,</li> <li>o Gestrekte nek, opisthotonus</li> <li>o Duidelijke symptomen van sepsis, zoals de combinatie van een rectale temperatuur &gt;40°C en niet aan te sporen tot beweging.</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> <li>o Ernstige kreupelheid aan 1 of meer gewrichten waarbij het gewricht zichtbaar gezwollen is en het dier deze niet meer wil belasten / niet meer wilt lopen (arthritis / poly-arthritis)</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 59,0% Matig 41,0% Licht	



<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>	HEP: 0-1%	Citaat. (...) <p>Milde tot matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40.5°C</li> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Speekselen</li> </ul> <p>Bij 2 waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;41°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander mild tot matig symptoom van toepassing is. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben (&gt;40.5°C) en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.</p> <p>Ernstige symptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet aan te sporen tot eten en drinken</li> <li>o Wanneer de big niet wil opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 57,0% Matig 43,0% Licht	

## 5 Samenvatting

5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

De aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVDXXXXX 5.1 lid2h. Er zijn vragen gesteld aan de aanvrager over de opbrengsten van de voorgaande projectvergunning, huisvesting, hergebruik, humane eindpunten, onderbouwing van de gevraagde aantallen en de NTS. De reactie van de aanvrager op deze vragen staat in 'AVD202114588g\_Beantwoording\_vragen\_CCD' en is 1 groene tekst



in de stukken aangegeven.

<sup>1</sup>De huisvesting voldoet niet aan bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. De DEC en het Secretariaat achten de ze afwijking voldoen de onderbouw. <sup>2</sup>

Er zal sprake zijn van hergebruik, de gebruikte zeugen doorlopen meerdere cycli. De aanvrager heeft aangegeven dat rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik.

Het <sup>3</sup>DEC advies was niet navolgbaar, daarom is de DEC gevraagd om aanvullend advies uit te brengen, zie 'AVD202114588e2\_Aanvulling DEC advies'. Deze aanvullingen hebben echter nieuwe vragen opgeroepen. In haar aanvullende advies geeft de DEC aan <sup>4</sup>levens aan te twifelen aan de opzet van het project, de haalbaarheid van de doelstellingen, de relevantie van geforceerde infectieproeven voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen en de omvang van de opbrengsten van het project.

Het project richt zich op voeding voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom de veehouderij geldt ook voor dit project. Hoewel in de intensieve veehouderij de gezondheid van de dieren onder druk staat, richt dit project zich op het ontwikkelen van diët en voer<sup>5</sup>strategieën om de weerbaarheid van biggen tegen streptokokken<sup>6</sup> infecties te bevorderen. Voor de dieren is er sprake van licht tot matig ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten naast economische aspecten ook potentiële gezondheidsaspecten voor de doeldieren, mogelijke duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu en wetenschappelijke inzichten.

De aanvrager heeft middels opbrengsten van de eerdere projectvergunning aannemelijk gemaakt dat voerstrategieën effect kunnen hebben op <sup>6</sup>streptokokken en e. coli concentraties in het spijsverteringskanaal en de immuun respons van biggen. De DEC is er echter niet van overtuigd dat deze effecten dusdanig groot zijn dat deze zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid van de dieren. Derhalve verwacht de DEC niet dat de beoogde infectieproeven zullen bijdragen aan een het welzijn van doeldieren en/of een transitie naar een duurzame veehouderij. Ook geeft de DEC aan dat <sup>7</sup>ok hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van <sup>8</sup>lekke onder biggen.

## 5.2 lid 1

# Pagina: 21

	Nummer: 1	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 07:47:13
	Nummer: 2 en bedding	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 3-7-2021 01:10:56
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 07:45:16
	Nummer: 3 initiele	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 3-7-2021 01:11:31
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 07:52:19
	Nummer: 4	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 01:11:41
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 07:52:14
	Nummer: 5 s. suis en e.coli	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Sticky Note	Datum: 3-7-2021 01:12:13
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 07:58:32
	Nummer: 6 s. suis	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 01:12:43
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 08:05:18
	Nummer: 7	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 01:13:26
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 08:11:04
	Nummer: 8	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 01:13:38
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 08:10:44
	Nummer: 9	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 01:14:35
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 08:10:20
	Nummer: 10 weg	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 01:14:51
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 08:10:15
	Nummer: 11	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Highlight	Datum: 3-7-2021 08:07:57
	Status	5.1 lid2e	Geaccepteerd	3-7-2021 08:10:11

## 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.



# Advies aan CCD

B

Datum 03 juli 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114588

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.  
Aanvraagnummer: AVD202114588  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	Vragen gesteld aan aanvrager: <ul style="list-style-type: none"><li>- Deze aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD5.1 lid2h. In het projectvoorstel wordt echter niet vermeld wat de opbrengsten van de proeven onder de voorgaande vergunning zijn geweest. Dit is echter relevante informatie voor het beoordelen van uw huidige projectaanvraag. Wij verzoeken u daarom om deze opbrengsten toe te voegen aan het projectvoorstel.</li><li>- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?</li><li>- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee minder leefruimte zullen hebben dan de minimaal voorgeschreven oppervlakte in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.</li><li>- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is onvoldoende navolgbaar in de bijlagen. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten zodat uit de bijlagen blijkt hoe het aantal dieren tot stand komt.</li><li>- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de</li></ul>
--------	---

	<p>humane eindpunten in iedere bijlage concreter te formuleren, zodat duidelijk blijkt wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.</p> <p>Vragen NTS:</p> <p>- Wij verzoeken u om de NTS aan te vullen onder 'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren', zodat deze een volledig beeld geeft van de inhoud van het project. Dus hier graag ook vermelden dat sommige biggen antibiotica zullen krijgen toegediend en/of op transport gaan, zeugen vaginale swabs krijgen en een deel van de dieren gedood zal worden.</p> <p>- Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	1.440	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	1.020	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	630	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen



Citaat.

De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Het is niet altijd mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De zeugen en biggen worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingsmaterialen.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van 5.1.102b. In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten).

### **Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst**

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

#### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

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

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

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

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

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

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

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Initieel DEC advies:</p> <p>Citaat C9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) x Hergebruik (1e, lid 2) De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.</p> <p>Citaat C10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.</p> <p>Citaat A9, vraag j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.) Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op de immuuncompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit</p>
-------------------	--

het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli of S. suis bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.

Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.

\*Zie ook het gehele aanvullende DEC advies 'AVD202114588e2\_Aanvulling DECadvies'.\*

\*\* Onder punt 5 op pagina 2 van het aanvullende DEC advies gaat de DEC in op de relevantie van de infectieproef. Zie hiervoor ook A9, vraag c. in het initiële DEC advies waarin de DEC de aanvrager verzoekt om deze te onderbouwen.\*\*

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het

lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:

De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.

Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande preventie strategieën (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).

3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.

De argumenten voor het minderheidsstandpunt kunnen als volgt worden samengevat: In het verleden gingen de voederproeven gepaard met ten hoogste licht ongerief, nu worden infectieproeven als interventie aan de voederproeven toegevoegd in een black box benadering, waarvoor de rationale ontbreekt. Voor de vrij algemeen voorkomende infecties met *Streptococcus suis* en *Escherichia coli* kunnen processen zoals kolonisatie, expressie van virulentiefactoren en translocatie worden onderscheiden. Omdat beide agentia algemeen voorkomen in varkenspopulaties kan de invloed van voeding op kolonisatie bij dieren op mucosaal niveau worden bestudeerd en zijn voldoende mogelijkheden beschikbaar om dergelijk

onderzoek uit te voeren. Een extra interventie, zoals voorgesteld door infectieproeven, is een confounder in het voorkomende natuurlijke kolonisatieproces en ontwikkeling van oraal/enteraal microbiom. Het effect van voeding op expressie van virulentiefactoren, in casu quorum sensing spelen zeer wel mogelijk een belangrijke rol bij het ontwikkelen van pathologische processen zoals weefselschade en/of translocatie. In het voorgestelde project kan geen onderscheid gemaakt worden in deze afzonderlijke processen en het leidt daarom niet tot vermeerdering van kennis maar alleen tot verhoging van ongerief. Een meer logische en voor de dieren minder belastende benadering zou een niet invasief onderzoek zijn waarbij de invloed van voeding en voedingscomponenten op de kwantitatieve aanwezigheid van beide bacteriën is in het orale/enterale microbiom. In aanvulling op de infectieproeven is de rationale voor het uitvoeren en interpreteren van LPS-immuun-competentie-experimenten onduidelijk.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:  
Huisvesting (initieel DEC advies).

Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.

Veehouderij dilemma (aanvullend DEC advies).

Het onderzoek moet inderdaad passen binnen de richtlijn die door de RDA wordt aangegeven wat betreft onderzoek naar intensieve veehouderij. Voor dit project ziet de DEC een ethisch dilemma bij het gebruik van proefdieren t.b.v. voederinterventies t.a.v. de huidige veehouderij. De belangrijke aandoeningen waar dit project over gaat, Streptococcus suis en E.coli veroorzaken beiden infecties die een ernstiger verloop hebben bij 'suboptimale' huisvesting, management en hygiëne. E.Coli en streptokokken zijn endemisch op alle varkensbedrijven in Nederland. Steeds meer zijn er ook initiatieven/innovaties op gebied van stalbouw, huisvesting en management en stemhygiëne die een substantiële bijdrage leveren aan het voorkomen van klinische symptomen t.a.v. genoemde kiemen, waardoor het welzijn en gezondheid van de dieren verbetert. Deze innovaties vragen wel vaak minder dieren per unit, meer stalverrijking waardoor dieren beter aan hun natuurlijke behoeftes/gedrag kunnen voldoen. Dergelijke inspanningen geven geen directe verbetering van het rendement en hebben een beperkte prioriteit. Goede voeding is heel belangrijk voor de gezondheid van het dier, maar

	of infectieproeven, die gedaan worden om kleine niet-relevante verschillen te vinden tussen de verschillende voeders/additieven zullen bijdragen aan een transitie naar een duurzame veehouderij is naar de mening van de DEC zeer twijfelachtig.
--	---

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. 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.
	<p>Uw initiële advies is moeilijk navolgbaar, omdat veel vragen zijn gesteld en de overwegingen die tot uw conclusies hebben geleid niet uit het advies naar voren komen. Ook in de beknopte ethische afweging is niet goed navolgbaar hoe de beantwoording van de centrale morele vraag toe een positief oordeel heeft geleid. Wanneer er initieel twijfels zijn geweest over aspecten van een aanvraag is het voor ons zeer waardevol om bij de beantwoording van de C vragen en centrale morele vraag inzicht te krijgen in de afwegingen die tot de uiteindelijke conclusie hebben geleid.</p> <p>Uw aanvullingen op het initiële advies hebben veel belangrijke additionele informatie gegeven die cruciaal is gebleken voor de beoordeling van het project. De inhoud van het aanvullende advies is in onze ogen echter niet in lijn met het positieve advies. Met name uw bedenkingen bij de gekozen strategie, relevantie van de infectieproef, opbrengsten en haalbaarheid van de doelstellingen lijken tegenstrijdig met het advies om het project te vergunnen. Ook was dit advies gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Wij zijn daarom bij de beoordeling van het project uitgegaan van onze eigen ethische afweging op basis van de alle beschikbare informatie vanuit de aanvrager, het initiële DEC advies en het aanvullende DEC advies.</p> <p>Wij erkennen het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het blijkt echter problematisch om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per project verschillend is. Het standpunt van de CCD aangaande deze afwijkingen is nee-tenzij. Hierbij is van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is.</p>

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat.</p> <p>De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen.</p> <p>Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en E. coli en S. suis infecties te verminderen.</p> <p>Uiteindelijke doel: Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale <b>5.1 lid2h</b>. Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.</p> <p>Hieronder vallen drie subdoelen: het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen</li><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen</li><li>• de immuun competentie van gespeende biggen</li></ul>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat. Wetenschappelijk belang Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbioom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.</p> <p>Maatschappelijk belang E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC initieel advies C7. Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij 5.1 lid2h acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.</p> <p>Citaat aanvullend DEC advies, pagina 2. (...) 3. Het viel de DEC op dat er gebrek was aan focus. Door voeding is het microbioom te beïnvloeden, daar is geen geforceerde infectie</p>



(infectieproef) voor nodig. In het project worden biggen overgelegd van de ene naar de andere zeug en er wordt antibiotica toegediend. Deze beide interventies verstoren het microbioom. Wanneer er antibiotica aan een dragende zeug wordt toegediend, heeft dit invloed op het microbioom van zowel de zeug als de biggen die later geboren worden.

4. De DEC heeft twijfels of het gekozen model geschikt is om een gezondheids/welzijnsclaim aan te tonen. De DEC is wel van mening dat er een verschuiving kan plaatsvinden van het darmmicrobiom d.m.v. voeding, waardoor mogelijk een verminderd risico op kolonisatie ontstaat, maar is er niet van overtuigd dat dit zal bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. De verschillende additieven die de onderzoeker wil testen zullen best een verschuiving in het microbiom teweeg brengen, maar hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren vormen tevens dominante risico's op het ontstaan van ziekte. In experimenten waar deze risico's als representatief voor de gangbare situatie "in het veld" worden geadresseerd, impliceert niet alleen een acceptatie van de huidige intensieve veehouderij, maar zet ook in op verdere intensivering.

5. Het is voor de DEC niet helder wat de bijdrage zal zijn van een infectieproef aan het vinden van een antwoord op de onderzoeksvraag. De onderzoeker heeft de DEC niet kunnen overtuigen van de relevantie hiervan.

Citaat aanvullend advies pagina 3, alinea 5 (dit is een minderheidsstandpunt).

Er treedt nu echter een verschuiving op, omdat de voederonderzoeksinstituten infectieproeven gaan uitvoeren, waardoor het ongerief verschuift van licht naar matig. Voor sommige DEC leden wordt hiermee een grens overschreden, omdat de huisvesting vaak niet helemaal op Wod is ingericht en omdat de kennis om goede infectieproeven uit te voeren minimaal aanwezig is. Corebusiness voor voedingsinstituten is voederonderzoek en volgens sommige DEC leden lijkt het door het toevoegen van infectieproeven PR motieven mogelijk meer prevaleren dan wetenschappelijke motieven.

5.2 lid1

### 3V's

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of in vitro onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In in vitro onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen in vitro studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> zie 3.4.3.1.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1., additioneel:</p> <p>Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen.</p>

	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via E. coli bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken.</p> <p>Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
--	---

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen: Citaat.	Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen: Zie 3.4.3.1.	
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen: zie 3.4.3.1.	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-2%	<p>Citaat. (...) Milde symptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Verminderde gewichtstoename</li> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> </ul> <p>Bij milde symptomen zonder dat één van de onderstaande matige of ernstige symptomen voor het maximale aantal waarnemingen optreedt zal het dier in de proef blijven.</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Matige uitdrogingsverschijnselen, zoals een rimpelige huid</li> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Big trilt en biggen liggen op/tegen elkaar</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts</li> <li>o Overgeven</li> </ul> <p>Bij het optreden van matige symptomen zal de huid turgor en slijmvliezen gecontroleerd worden. Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en</p>

		<p>ter sectie aangeboden.</p> <p>* Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan E. coli gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Rectale temperatuur &lt;39 °C</li> <li>o Ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor (huidplooi blijft staan) of diep ingevallen ogen</li> <li>o Afwijkende kleur van de slijmvliezen</li> <li>o Bloederige diarree</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 63,0% Matig 37,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-3%	<p>Citaat. (...)</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts.</li> <li>o Zichtbare kreupelheid aan 1 poot waarbij de gewrichten niet gezwollen zijn en het dier deze nog wil belasten</li> </ul> <p>Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>

		<p>*Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan S. suis gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Duidelijke symptomen van hersenverschijnselen die wijzen op meningitis, zoals</li> <li>o Evenwichtsstoornissen</li> <li>o Slechte coördinatie</li> <li>o Kopschudden,</li> <li>o Op 1 zijde liggen,</li> <li>o Snelle oogbewegingen,</li> <li>o Gestrekte nek, opisthotonus</li> <li>o Duidelijke symptomen van sepsis, zoals de combinatie van een rectale temperatuur &gt;40°C en niet aan te sporen tot beweging.</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> <li>o Ernstige kreupelheid aan 1 of meer gewrichten waarbij het gewricht zichtbaar gezwollen is en het dier deze niet meer wil belasten / niet meer wilt lopen (arthritis / poly-arthritis)</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 59,0% Matig 41,0% Licht	



<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>	HEP: 0-1%	Citaat. (...) Milde tot matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging: <ul style="list-style-type: none"> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40.5°C</li> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Speeksel</li> </ul> Bij 2 waarnemingen van een rectale temperatuur >41°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander mild tot matig symptoom van toepassing is. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben (>40.5°C) en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.  Ernstige symptomen: <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet aan te sporen tot eten en drinken</li> <li>o Wanneer de big niet wil opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 57,0% Matig 43,0% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

[REDACTED] e aanvraag is een  
vervolg op de projectvergunning AVDXXXXX5.1 lid2h. Er zijn vragen gesteld aan de aanvrager over de opbrengsten van de voorgaande projectvergunning, huisvesting, hergebruik, humane eindpunten, onderbouwing van de gevraagde aantallen en de NTS. De reactie van de aanvrager op deze vragen staat in 'AVD202114588g\_Beantwoording\_vragen\_CCD' en is met groene

tekst in de stukken aangegeven.

De huisvesting voldoet niet aan bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking, ook zullen de dieren geen strooisel krijgen. De DEC en het Secretariaat achten de ze afwijking voldoen de onderbouwd.

Er zal sprake zijn van hergebruik, de gebruikte zeugen doorlopen meerdere cycli. De aanvrager heeft aangegeven dat rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik.

Dieren zullen tijdens bloedafnames geen pijnstilling krijgen. In de ogen van het Secretariaat is dit niet noodzakelijk en voldoende onderbouwd.

Het initiële DEC advies was niet goed navolgbaar, daarom is de DEC gevraagd om aanvullend advies uit te brengen, zie 'AVD202114588e2\_Aanvulling DEC advies'. Deze aanvullingen hebben echter nieuwe vragen opgeroepen. In haar aanvullende advies geeft de DEC aan bedenkingen te hebben bij de opzet van het project, de haalbaarheid van de doelstellingen, de relevantie van geforceerde infectieproeven voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen en de opbrengsten van het project.

Het project richt zich op voeding voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom de veehouderij geldt ook voor dit project. Hoewel in de intensieve veehouderij de gezondheid van de dieren onder druk staat, richt dit project zich op het ontwikkelen van dieet en voederstrategieën om de weerbaarheid van biggen tegen *e. suis* en *e. coli* te bevorderen. Voor de dieren is er sprake van licht tot matig ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten naast economische en wetenschappelijke aspecten ook een verbetering van gezondheid (welzijn) van doeldieren en duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu.

De aanvrager heeft middels opbrengsten van de eerdere projectvergunning aannemelijk gemaakt dat voerstrategieën effect kunnen hebben op *s. suis* en *e. coli* concentraties in het spijsverteringskanaal en de immuun respons van biggen. De DEC is er echter niet van overtuigd dat deze effecten dusdanig groot zijn dat deze zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid van de dieren. Derhalve verwacht de DEC niet dat de beoogde infectieproeven zullen bijdragen aan een het welzijn van doeldieren en/of een transitie naar een duurzame veehouderij. Ook geeft de DEC aan dat klinische streptokokkeninfecties vaak samenhangen met het vroeg en abrupt spenen van biggen en dat hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren tevens grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van ziekte onder biggen.

5.2 lid1

A large rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill. The redaction covers the majority of the page's content.

**6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

A large rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill. The redaction covers the majority of the page's content.

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.



# Advies aan CCD

**B**

Datum 20 juli 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114588

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.  
Aanvraagnummer: AVD202114588  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	
	<p>Vragen gesteld aan aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Deze aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h. In het projectvoorstel wordt echter niet vermeld wat de opbrengsten van de proeven onder de voorgaande vergunning zijn geweest. Dit is echter relevante informatie voor het beoordelen van uw huidige projectaanvraag. Wij verzoeken u daarom om deze opbrengsten toe te voegen aan het projectvoorstel.</li><li>- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?</li><li>- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee minder leefruimte zullen hebben dan de minimaal voorgeschreven oppervlakte in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.</li><li>- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is onvoldoende navolgbaar in de bijlagen. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten zodat uit de bijlagen blijkt hoe het aantal dieren tot stand komt.</li><li>- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de</li></ul>

<p>humane eindpunten in iedere bijlage concreter te formuleren, zodat duidelijk blijkt wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.</p> <p>Vragen NTS:</p> <p>- Wij verzoeken u om de NTS aan te vullen onder 'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren', zodat deze een volledig beeld geeft van de inhoud van het project. Dus hier graag ook vermelden dat sommige biggen antibiotica zullen krijgen toegediend en/of op transport gaan, zeugen vaginale swabs krijgen en een deel van de dieren gedood zal worden.</p> <p>- Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	1.440	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	1.020	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	630	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Citaat.

De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Het is niet altijd mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De zeugen en biggen worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingsmaterialen.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van 5.1.102b. In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten).

### **Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst**

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

#### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

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

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

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

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

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

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

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Initieel DEC advies:</p> <p>Citaat C9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) x Hergebruik (1e, lid 2) De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.</p> <p>Citaat C10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.</p> <p>Citaat A9, vraag j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.) Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op de immuuncompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit</p>
-------------------	--



het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli of S. suis bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.

Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.

\*Zie ook het gehele aanvullende DEC advies 'AVD202114588e2\_Aanvulling DECadvies'.\*

\*\* Onder punt 5 op pagina 2 van het aanvullende DEC advies gaat de DEC in op de relevantie van de infectieproef. Zie hiervoor ook A9, vraag c. in het initiële DEC advies waarin de DEC de aanvrager verzoekt om deze te onderbouwen.\*\*

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het

lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:

De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.

Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande preventie strategieën (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).

3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.

De argumenten voor het minderheidsstandpunt kunnen als volgt worden samengevat: In het verleden gingen de voederproeven gepaard met ten hoogste licht ongerief, nu worden infectieproeven als interventie aan de voederproeven toegevoegd in een black box benadering, waarvoor de rationale ontbreekt. Voor de vrij algemeen voorkomende infecties met *Streptococcus suis* en *Escherichia coli* kunnen processen zoals kolonisatie, expressie van virulentiefactoren en translocatie worden onderscheiden. Omdat beide agentia algemeen voorkomen in varkenspopulaties kan de invloed van voeding op kolonisatie bij dieren op mucosaal niveau worden bestudeerd en zijn voldoende mogelijkheden beschikbaar om dergelijk

onderzoek uit te voeren. Een extra interventie, zoals voorgesteld door infectieproeven, is een confounder in het voorkomende natuurlijke kolonisatieproces en ontwikkeling van oraal/enteraal microbiom. Het effect van voeding op expressie van virulentiefactoren, in casu quorum sensing spelen zeer wel mogelijk een belangrijke rol bij het ontwikkelen van pathologische processen zoals weefselschade en/of translocatie. In het voorgestelde project kan geen onderscheid gemaakt worden in deze afzonderlijke processen en het leidt daarom niet tot vermeerdering van kennis maar alleen tot verhoging van ongerief. Een meer logische en voor de dieren minder belastende benadering zou een niet invasief onderzoek zijn waarbij de invloed van voeding en voedingscomponenten op de kwantitatieve aanwezigheid van beide bacteriën is in het orale/enterale microbiom. In aanvulling op de infectieproeven is de rationale voor het uitvoeren en interpreteren van LPS-immuun-competentie-experimenten onduidelijk.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:  
Huisvesting (initieel DEC advies).

Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.

Veehouderij dilemma (aanvullend DEC advies).

Het onderzoek moet inderdaad passen binnen de richtlijn die door de RDA wordt aangegeven wat betreft onderzoek naar intensieve veehouderij. Voor dit project ziet de DEC een ethisch dilemma bij het gebruik van proefdieren t.b.v. voederinterventies t.a.v. de huidige veehouderij. De belangrijke aandoeningen waar dit project over gaat, Streptococcus suis en E.coli veroorzaken beiden infecties die een ernstiger verloop hebben bij 'suboptimale' huisvesting, management en hygiëne. E.Coli en streptokokken zijn endemisch op alle varkensbedrijven in Nederland. Steeds meer zijn er ook initiatieven/innovaties op gebied van stalbouw, huisvesting en management en stemhygiëne die een substantiële bijdrage leveren aan het voorkomen van klinische symptomen t.a.v. genoemde kiemen, waardoor het welzijn en gezondheid van de dieren verbetert. Deze innovaties vragen wel vaak minder dieren per unit, meer stalverrijking waardoor dieren beter aan hun natuurlijke behoeftes/gedrag kunnen voldoen. Dergelijke inspanningen geven geen directe verbetering van het rendement en hebben een beperkte prioriteit. Goede voeding is heel belangrijk voor de gezondheid van het dier, maar

	of infectieproeven, die gedaan worden om kleine niet-relevante verschillen te vinden tussen de verschillende voeders/additieven zullen bijdragen aan een transitie naar een duurzame veehouderij is naar de mening van de DEC zeer twijfelachtig.
--	---

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. 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.
	<p>Uw initiële advies is moeilijk navolgbaar, omdat veel vragen zijn gesteld en de overwegingen die tot uw conclusies hebben geleid niet uit het advies naar voren komen. Ook in de beknopte ethische afweging is niet goed navolgbaar hoe de beantwoording van de centrale morele vraag toe een positief oordeel heeft geleid. Wanneer er initieel twijfels zijn geweest over aspecten van een aanvraag is het voor ons zeer waardevol om bij de beantwoording van de C vragen en centrale morele vraag inzicht te krijgen in de afwegingen die tot de uiteindelijke conclusie hebben geleid.</p> <p>Uw aanvullingen op het initiële advies hebben veel belangrijke additionele informatie gegeven die cruciaal is gebleken voor de beoordeling van het project. De inhoud van het aanvullende advies is in onze ogen echter niet in lijn met het positieve advies. Met name uw bedenkingen bij de gekozen strategie, relevantie van de infectieproef, opbrengsten en haalbaarheid van de doelstellingen lijken tegenstrijdig met het advies om het project te vergunnen. Ook was dit advies gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Wij zijn daarom bij de beoordeling van het project uitgegaan van onze eigen ethische afweging op basis van de alle beschikbare informatie vanuit de aanvrager, het initiële DEC advies en het aanvullende DEC advies.</p> <p>Wij erkennen het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het blijkt echter problematisch om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per project verschillend is. Het standpunt van de CCD aangaande deze afwijkingen is nee-tenzij. Hierbij is van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is.</p>

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat.</p> <p>De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen.</p> <p>Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en E. coli en S. suis infecties te verminderen.</p> <p>Uiteindelijke doel: Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale <b>5.1 lid2h</b>. Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.</p> <p>Hieronder vallen drie subdoelen: het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen</li><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen</li><li>• de immuun competentie van gespeende biggen</li></ul>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat. Wetenschappelijk belang Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbiom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.</p> <p>Maatschappelijk belang E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC initieel advies C7. Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij 5.1 lid2h acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.</p> <p>Citaat aanvullend DEC advies, pagina 2. (...) 3. Het viel de DEC op dat er gebrek was aan focus. Door voeding is het microbiom te beïnvloeden, daar is geen geforceerde infectie</p>

(infectieproef) voor nodig. In het project worden biggen overgelegd van de ene naar de andere zeug en er wordt antibiotica toegediend. Deze beide interventies verstoren het microbiom. Wanneer er antibiotica aan een dragende zeug wordt toegediend, heeft dit invloed op het microbiom van zowel de zeug als de biggen die later geboren worden.

4. De DEC heeft twijfels of het gekozen model geschikt is om een gezondheids/welzijnsclaim aan te tonen. De DEC is wel van mening dat er een verschuiving kan plaatsvinden van het darmmicrobiom d.m.v. voeding, waardoor mogelijk een verminderd risico op kolonisatie ontstaat, maar is er niet van overtuigd dat dit zal bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. De verschillende additieven die de onderzoeker wil testen zullen best een verschuiving in het microbiom teweeg brengen, maar hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren vormen tevens dominante risico's op het ontstaan van ziekte. In experimenten waar deze risico's als representatief voor de gangbare situatie "in het veld" worden geadresseerd, impliceert niet alleen een acceptatie van de huidige intensieve veehouderij, maar zet ook in op verdere intensivering.

5. Het is voor de DEC niet helder wat de bijdrage zal zijn van een infectieproef aan het vinden van een antwoord op de onderzoeksvraag. De onderzoeker heeft de DEC niet kunnen overtuigen van de relevantie hiervan.

Citaat aanvullend advies pagina 3, alinea 5 (dit is een minderheidsstandpunt).

Er treedt nu echter een verschuiving op, omdat de voederonderzoeksinstituten infectieproeven gaan uitvoeren, waardoor het ongerief verschuift van licht naar matig. Voor sommige DEC leden wordt hiermee een grens overschreden, omdat de huisvesting vaak niet helemaal op Wod is ingericht en omdat de kennis om goede infectieproeven uit te voeren minimaal aanwezig is. Corebusiness voor voedingsinstituten is voederonderzoek en volgens sommige DEC leden lijkt het door het toevoegen van infectieproeven PR motieven mogelijk meer prevaleren dan wetenschappelijke motieven.

5.2 lid1

### 3V's

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of in vitro onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In in vitro onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen in vitro studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> zie 3.4.3.1.</p>



Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1., additioneel:</p> <p>Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen.</p>

	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via E. coli bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken.</p> <p>Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
--	---

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen: Citaat.	Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen: Zie 3.4.3.1.	
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen: zie 3.4.3.1.	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-2%	<p>Citaat. (...) Milde symptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Verminderde gewichtstoename</li> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> </ul> <p>Bij milde symptomen zonder dat één van de onderstaande matige of ernstige symptomen voor het maximale aantal waarnemingen optreedt zal het dier in de proef blijven.</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Matige uitdrogingsverschijnselen, zoals een rimpelige huid</li> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Big trilt en biggen liggen op/tegen elkaar</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts</li> <li>o Overgeven</li> </ul> <p>Bij het optreden van matige symptomen zal de huid turgor en slijmvliezen gecontroleerd worden. Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en</p>

		<p>ter sectie aangeboden.</p> <p>* Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan E. coli gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Rectale temperatuur &lt;39 °C</li> <li>o Ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor (huidplooi blijft staan) of diep ingevallen ogen</li> <li>o Afwijkende kleur van de slijmvliezen</li> <li>o Bloederige diarree</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 63,0% Matig 37,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-3%	<p>Citaat. (...)</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts.</li> <li>o Zichtbare kreupelheid aan 1 poot waarbij de gewrichten niet gezwollen zijn en het dier deze nog wil belasten</li> </ul> <p>Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>

		<p>*Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan S. suis gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Duidelijke symptomen van hersenverschijnselen die wijzen op meningitis, zoals</li> <li>o Evenwichtsstoornissen</li> <li>o Slechte coördinatie</li> <li>o Kopschudden,</li> <li>o Op 1 zijde liggen,</li> <li>o Snelle oogbewegingen,</li> <li>o Gestrekte nek, opisthotonus</li> <li>o Duidelijke symptomen van sepsis, zoals de combinatie van een rectale temperatuur &gt;40°C en niet aan te sporen tot beweging.</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> <li>o Ernstige kreupelheid aan 1 of meer gewrichten waarbij het gewricht zichtbaar gezwollen is en het dier deze niet meer wil belasten / niet meer wilt lopen (arthritis / poly-arthritis)</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 59,0% Matig 41,0% Licht	

<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>	HEP: 0-1%	<p>Citaat. (...) Milde tot matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40.5°C</li> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Speeksel</li> </ul> <p>Bij 2 waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;41°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander mild tot matig symptoom van toepassing is. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben (&gt;40.5°C) en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.</p> <p>Ernstige symptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet aan te sporen tot eten en drinken</li> <li>o Wanneer de big niet wil opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 57,0% Matig 43,0% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

[REDACTED]. De aanvraag is een  
 [REDACTED] 5.1 lid2h. Er zijn vragen gesteld  
 vervolg op de projectvergunning AVDXXXXX. Er zijn vragen gesteld  
 aan de aanvrager over de opbrengsten van de voorgaande projectvergunning,  
 huisvesting, hergebruik, humane eindpunten, onderbouwing van de  
 gevraagde aantallen en de NTS. De reactie van de aanvrager op deze vragen  
 staat in 'AVD202114588g\_Beantwoording\_vragen\_CCD' en is met groene

tekst in de stukken aangegeven.

De huisvesting voldoet niet aan bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking, ook zullen de dieren geen strooisel krijgen. De DEC en het Secretariaat achten de ze afwijking voldoen de onderbouwd.

Er zal sprake zijn van hergebruik, de gebruikte zeugen doorlopen meerdere cycli. De aanvrager heeft aangegeven dat rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik.

Dieren zullen tijdens bloedafnames geen pijnstilling krijgen. In de ogen van het Secretariaat is dit niet noodzakelijk en voldoende onderbouwd.

Het initiële DEC advies was niet goed navolgbaar, daarom is de DEC gevraagd om aanvullend advies uit te brengen, zie 'AVD202114588e2\_Aanvulling DEC advies'. Deze aanvullingen hebben echter nieuwe vragen opgeroepen. In haar aanvullende advies geeft de DEC aan bedenkingen te hebben bij de opzet van het project, de haalbaarheid van de doelstellingen, de relevantie van geforceerde infectieproeven voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen en de opbrengsten van het project.

Het project richt zich op voeding voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom de veehouderij geldt ook voor dit project. Hoewel in de intensieve veehouderij de gezondheid van de dieren onder druk staat, richt dit project zich op het ontwikkelen van diët en voederstrategieën om de weerbaarheid van biggen tegen *e. suis* en *e. coli* te bevorderen. Voor de dieren is er sprake van licht tot matig ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten naast economische en wetenschappelijke aspecten ook een verbetering van gezondheid (welzijn) van doeldieren en duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu.

De aanvrager heeft middels opbrengsten van de eerdere projectvergunning aannemelijk gemaakt dat voerstrategieën effect kunnen hebben op *s. suis* en *e. coli* concentraties in het spijsverteringskanaal en de immuun respons van biggen. De DEC is er echter niet van overtuigd dat deze effecten dusdanig groot zijn dat deze zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid van de dieren. Derhalve verwacht de DEC niet dat de beoogde infectieproeven zullen bijdragen aan een het welzijn van doeldieren en/of een transitie naar een duurzame veehouderij. Ook geeft de DEC aan dat klinische streptokokkeninfecties vaak samenhangen met het vroeg en abrupt spenen van biggen en dat hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren tevens grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van ziekte onder biggen.



5.2 lid1



**6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1



**7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



# Advies aan CCD

**B**

Datum 26 juli 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114588

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.  
Aanvraagnummer: AVD202114588  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	Vragen gesteld aan aanvrager: <ul style="list-style-type: none"><li>- Deze aanvraag is een vervolg op de projectvergunning AVD 5.1 lid2h. In het projectvoorstel wordt echter niet vermeld wat de opbrengsten van de proeven onder de voorgaande vergunning zijn geweest. Dit is echter relevante informatie voor het beoordelen van uw huidige projectaanvraag. Wij verzoeken u daarom om deze opbrengsten toe te voegen aan het projectvoorstel.</li><li>- Er zal sprake zijn van hergebruik, omdat de gebruikte zeugen meerder cycli zullen doorlopen. Uit de bijlagen blijkt niet of hierbij rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik. Kunt u dit punt toelichten?</li><li>- Wij verzoeken u om te onderbouwen waarom de zeugen in kraamhokken van 2.10 x 0.65m gehuisvest worden, en daarmee minder leefruimte zullen hebben dan de minimaal voorgeschreven oppervlakte in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.</li><li>- De berekening van het benodigde aantal dieren per proefgroep is onvoldoende navolgbaar in de bijlagen. Zo is bijvoorbeeld niet beschreven welke parameters u zult gebruiken bij de powerberekeningen. Wij verzoeken u daarom om de beschreven KSV methode en powerberekeningen verder toe te lichten zodat uit de bijlagen blijkt hoe het aantal dieren tot stand komt.</li><li>- Het is op basis van de bijlagen onvoldoende duidelijk wanneer een dier precies een humaan eindpunt zal bereiken. Wij verzoeken u om de</li></ul>
--------	--

<p>humane eindpunten in iedere bijlage concreter te formuleren, zodat duidelijk blijkt wanneer een dier uit de proef zal worden genomen.</p> <p>Vragen NTS:</p> <p>- Wij verzoeken u om de NTS aan te vullen onder 'Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren', zodat deze een volledig beeld geeft van de inhoud van het project. Dus hier graag ook vermelden dat sommige biggen antibiotica zullen krijgen toegediend en/of op transport gaan, zeugen vaginale swabs krijgen en een deel van de dieren gedood zal worden.</p> <p>- Wij verzoeken u om onder verfijning uitgebreider stil te staan bij de specifieke maatregelen die worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken.</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	1.440	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	1.020	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>
<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Zeugen en biggen	630	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

### Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de grote rol van het darmmicrobioom op het risico voor E. coli infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018). De zeugen en zogende biggen zullen worden voorzien van niet-eetbare hokverrijking.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten van **5.1 lid2h**. Het klimaat in de afdeling wordt via een computer gestuurd wat betreft licht, ventilatie en temperatuur. De hokken in de lab faciliteiten zijn 2,00 x 1,00 meter, waarin de gespeende biggen in groepen van 2 tot 5 zullen worden gehuisvest tot 4 weken na spenen. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De vloer van de hokken bestaat uit tenderfoot roosters, waarbij een deel dichte vloer gecreëerd wordt met matten. Het verstrekken van strooisel is niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli bacteriën op het strooisel komen en de dieren dit strooisel opeten. De biggen worden voorzien van niet-eetbare speeltjes, die dagelijks worden gewisseld.

3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Citaat.

De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Het is niet altijd mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Per proef zal bekeken worden of de dieren van strooisel voorzien kunnen worden. Dit is afhankelijk van het type voeradditief of voer(productie)strategie, zijn werkingsmechanisme, en de te testen uitkomstparameters. De zeugen en biggen worden altijd voorzien van niet-eetbare verrijkingsmaterialen.

Tijdens de dracht worden de zeugen in groepshuisvesting gehouden, in groepen van ongeveer 150 zeugen. Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen gehuisvest in kraamhokken die voldoen aan richtlijn 2010/63/EU. De zeugen kunnen vrij bewegen, en worden alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet (2,24 x 0,65m) om uitval van biggen door het gaan liggen van de zeug te minimaliseren. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal.

Na het spenen zullen de biggen worden gehuisvest in de lab faciliteiten of gespeende biggenstal van 5.1.102b. In de proeven in deze bijlage worden geen levende ziekteverwekkers gebruikt, waardoor er geen sprake is van een mogelijke besmetting van andere dieren en het dus niet noodzakelijk is de dieren in de lab faciliteiten te huisvesten. Per proef zal daarom bekeken worden of de biggen in de lab faciliteiten (in groepen tot 5 biggen per hok) of in de gespeende biggenstal (in groepen tot 6-8 biggen per hok) gehuisvest zullen worden. Proeven zullen alleen in de lab faciliteiten plaatsvinden wanneer euthanasie nodig is om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De stal voldoet tijdens de gehele proef aan de minimale omvang van de leefruimte voor biggen, minimaal bodemoppervlak per big en de minimale ligruimte per big, zoals in richtlijn 2010/63/EU omschreven. De biggen hebben ten alle tijden voldoende ruimte om dierspecifiek gedrag te vertonen en te liggen, ook zijdelings. De hokken hebben een roostervloer met een deel dichte vloer (in de lab faciliteiten gecreeërd door middel van matten).

### **Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst**

#### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

Citaat.

De varkens kunnen kortdurende pijn ervaren tijdens bloedafname. Het ongemak van het aanprikken is gering. Hiervoor zullen geen pijnstillende methoden worden gebruikt, omdat deze het bijbehorende ongemak niet verminderen. Het aanbrengen van een plaatselijke verdovende crème zal niet toegepast worden, omdat het dier dan tweemaal gehanteerd dient te worden in verband met de inwerktijd van de crème, en hanteren brengt (het zij geringe) onrust met zich mee. De diameter van de naald en het bloedafname volume worden zo klein mogelijk gehouden (NC3Rs).

#### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

Zie 3.4.3.1.

#### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

Zie 3.4.3.1.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen

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

### 3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen

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

### 3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen

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

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

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Initieel DEC advies:</p> <p>Citaat C9. Er is sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) x Hergebruik (1e, lid 2) De DEC acht de keuze hiervoor voldoende onderbouwd.</p> <p>Citaat C10. Nee, huisvesting voldoet niet aan de huisvestingseisen in de Wod. Dit werd in de oorspronkelijke aanvraag wel beschreven, maar niet beargumenteerd. Dit kon op deze manier dus niet goedgekeurd worden door de DEC. Zie vraag J onder A9. De DEC acht het afwijken van de huisvestingsnormen in de Wod nu voldoende beargumenteerd.</p> <p>Citaat A9, vraag j. Afwijkende huisvesting wordt wel vermeld in de aanvraag, maar niet beargumenteerd. Op welke manier en met welke motivatie wordt afgeweken van de norm van de Wod, en welke invloed heeft dit op het ongerief voor zowel zeug als big? (In het bijzonder wordt ook aandacht gevraagd voor de huisvesting van de zeug in het kraamhok.) Er wordt afgeweken van de norm van de Wod omtrent eetbare hokverrijking. Vanwege de rol van het darmmicrobioom op de immuuncompetentie en het risico voor bacteriële infecties is het niet mogelijk om de dieren te voorzien van eetbare hokverrijking, omdat dit</p>
-------------------	--

het darmmicrobioom en het immuunsysteem kan beïnvloeden (Kubasova et al., 2017; Wen et al., 2018; Luo et al., 2020). Voor geïnoculeerde biggen is het verstrekken van eetbare hokverrijking bovendien ook niet mogelijk in verband met het risico op het verhogen van de infectiedruk als de E. coli of S. suis bacteriën op het eetbare materiaal komen en de dieren dit opeten. De dieren worden daarom voorzien van niet-eetbare hokverrijking. Het ontbreken van eetbare hokverrijking is meegenomen in de inschatting van het ongerief. Wij zijn van mening dat met de beschreven huisvesting de huidige ongeriefsclassificatie niet overschreden wordt, omdat de huisvesting op de andere punten aan besluit houders voor dieren en de norm van de Wod voldoet. Dit antwoord is in de bijlagen verduidelijkt onder 'C. Huisvesting en verzorging' en 'F. Classificatie van het ongerief'.

Toelichting huisvesting van de zeug in het kraamhok: Vanaf één week voor werpen tot spenen worden de zeugen (welke in dit onderzoek uitsluitend bemonsterd worden, wat licht ongerief oplevert) gehuisvest in praktijkhuisvesting, namelijk kraamhokken met een afmeting van 2.10 x 0.65 m voor de zeug en 2.10 x 2.00 m voor de zogende biggen. In de laatste week vóór werpen beschikken de zeugen over een jute zak als nestmateriaal. Momenteel wordt de kraamstal gerenoveerd en worden vrijloopsystemen voor de zeugen geplaatst. In dit nieuwe systeem kunnen de zeugen zich vrij bewegen, en worden ze alleen de eerste dagen na het werpen vastgezet. Gedurende deze periode wordt gebruik gemaakt van een beweegbare vloer. De vloer komt automatisch omhoog wanneer de zeug opstaat en gaat omlaag wanneer ze ligt. Dit minimaliseert het aantal biggen dat uitvalt in vrijloopsystemen door het gaan liggen van de zeug. Wij hopen in 2021 de renovaties af te ronden. Na afronding zullen de benoemde proeven in dit projectvoorstel met deze hokken uitgevoerd worden. U bent van harte welkom om de faciliteiten te komen bekijken tijdens een bezoek.

\*Zie ook het gehele aanvullende DEC advies 'AVD202114588e2\_Aanvulling DECadvies'.\*

\*\* Onder punt 5 op pagina 2 van het aanvullende DEC advies gaat de DEC in op de relevantie van de infectieproef. Zie hiervoor ook A9, vraag c. in het initiële DEC advies waarin de DEC de aanvrager verzoekt om deze te onderbouwen.\*\*

Ethische afweging van de DEC:

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voederstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het

lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?

2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:

De proefdieren ondervinden licht of matig ongerief door de experimentele handelingen. 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.

Het gezondheids-/welzijnsbelang voor de doeldieren (biggen) is niet goed in te schatten. Afhankelijk van de uitkomsten kan het project een beperkte bijdrage leveren aan de gezondheid van pasgespeende biggen. De effecten zijn waarschijnlijk niet erg groot en de onderzoekers stellen daarom in hun reactie op vragen van de DEC dat de preventie van infectieuze dierziekten altijd vraagt om een combinatie van voeraanpassing met ook reeds bestaande preventie strategieën (managementmaatregelen, hygiënemaatregelen).

3. Op basis van bovenstaande overwegingen, en acceptierend dat afwijken van Wod en om vervolgens de wettelijke huisvestingsnormen voor landbouwhuisdieren te hanteren bij voedingsonderzoek stuit voor de DEC niet op ethische bezwaren.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid onthield zich van stemming door blijvende twijfel over de rechtvaardiging van infectieproeven bij voedingsonderzoek.

De argumenten voor het minderheidsstandpunt kunnen als volgt worden samengevat: In het verleden gingen de voederproeven gepaard met ten hoogste licht ongerief, nu worden infectieproeven als interventie aan de voederproeven toegevoegd in een black box benadering, waarvoor de rationale ontbreekt. Voor de vrij algemeen voorkomende infecties met *Streptococcus suis* en *Escherichia coli* kunnen processen zoals kolonisatie, expressie van virulentiefactoren en translocatie worden onderscheiden. Omdat beide agentia algemeen voorkomen in varkenspopulaties kan de invloed van voeding op kolonisatie bij dieren op mucosaal niveau worden bestudeerd en zijn voldoende mogelijkheden beschikbaar om dergelijk



onderzoek uit te voeren. Een extra interventie, zoals voorgesteld door infectieproeven, is een confounder in het voorkomende natuurlijke kolonisatieproces en ontwikkeling van oraal/enteraal microbiom. Het effect van voeding op expressie van virulentiefactoren, in casu quorum sensing spelen zeer wel mogelijk een belangrijke rol bij het ontwikkelen van pathologische processen zoals weefselschade en/of translocatie. In het voorgestelde project kan geen onderscheid gemaakt worden in deze afzonderlijke processen en het leidt daarom niet tot vermeerdering van kennis maar alleen tot verhoging van ongerief. Een meer logische en voor de dieren minder belastende benadering zou een niet invasief onderzoek zijn waarbij de invloed van voeding en voedingscomponenten op de kwantitatieve aanwezigheid van beide bacteriën is in het orale/enterale microbiom. In aanvulling op de infectieproeven is de rationale voor het uitvoeren en interpreteren van LPS-immuun-competentie-experimenten onduidelijk.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:  
Huisvesting (initieel DEC advies).

Zoals bij eerder projecten van deze aanvrager, is ook hier het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen aan de orde. De noodzaak om af te wijken van de Wod normen is lastig in te schatten, maar wel belangrijk bij het maken van de afwegingen. De DEC zou graag zien dat hier op landelijk niveau aandacht aan besteed zou worden, met oog op toekomstige afwegingen op dit punt.

Veehouderij dilemma (aanvullend DEC advies).

Het onderzoek moet inderdaad passen binnen de richtlijn die door de RDA wordt aangegeven wat betreft onderzoek naar intensieve veehouderij. Voor dit project ziet de DEC een ethisch dilemma bij het gebruik van proefdieren t.b.v. voederinterventies t.a.v. de huidige veehouderij. De belangrijke aandoeningen waar dit project over gaat, Streptococcus suis en E.coli veroorzaken beiden infecties die een ernstiger verloop hebben bij 'suboptimale' huisvesting, management en hygiëne. E.Coli en streptokokken zijn endemisch op alle varkensbedrijven in Nederland. Steeds meer zijn er ook initiatieven/innovaties op gebied van stalbouw, huisvesting en management en stemhygiëne die een substantiële bijdrage leveren aan het voorkomen van klinische symptomen t.a.v. genoemde kiemen, waardoor het welzijn en gezondheid van de dieren verbetert. Deze innovaties vragen wel vaak minder dieren per unit, meer stalverrijking waardoor dieren beter aan hun natuurlijke behoeftes/gedrag kunnen voldoen. Dergelijke inspanningen geven geen directe verbetering van het rendement en hebben een beperkte prioriteit. Goede voeding is heel belangrijk voor de gezondheid van het dier, maar

	of infectieproeven, die gedaan worden om kleine niet-relevante verschillen te vinden tussen de verschillende voeders/additieven zullen bijdragen aan een transitie naar een duurzame veehouderij is naar de mening van de DEC zeer twijfelachtig.
--	---

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. 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.</p>
	<p>Uw initiële advies is moeilijk navolgbaar, omdat veel vragen zijn gesteld en de overwegingen die tot uw conclusies hebben geleid niet uit het advies naar voren komen. Ook in de beknopte ethische afweging is niet goed navolgbaar hoe de beantwoording van de centrale morele vraag toe een positief oordeel heeft geleid. Wanneer er initieel twijfels zijn geweest over aspecten van een aanvraag is het voor ons zeer waardevol om bij de beantwoording van de C vragen en centrale morele vraag inzicht te krijgen in de afwegingen die tot de uiteindelijke conclusie hebben geleid.</p> <p>Uw aanvullingen op het initiële advies hebben veel belangrijke additionele informatie gegeven die cruciaal is gebleken voor de beoordeling van het project. De inhoud van het aanvullende advies is in onze ogen echter niet in lijn met het positieve advies. Met name uw bedenkingen bij de gekozen strategie, relevantie van de infectieproef, opbrengsten en haalbaarheid van de doelstellingen lijken tegenstrijdig met het advies om het project te vergunnen. Ook was dit advies gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Wij zijn daarom bij de beoordeling van het project uitgegaan van onze eigen ethische afweging op basis van de alle beschikbare informatie vanuit de aanvrager, het initiële DEC advies en het aanvullende DEC advies.</p> <p>Wij erkennen het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het blijkt echter problematisch om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per project verschillend is. Het standpunt van de CCD aangaande deze afwijkingen is nee-tenzij. Hierbij is van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is.</p>

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat.</p> <p>De directe doelstelling van het project is het ontwikkelen van gezondheid bevorderende voerconcepten, waarbinnen voer(productie)strategieën en/of voeradditieven op de meest effectieve wijze kunnen worden ingezet. Hiertoe worden voeders vóór of na het werpen aan de zeug verstrekt of kort na de geboorte / rondom het spenen aan biggen, met als doel om de darmgezondheid en weerbaarheid van gespeende biggen tegen infectieuze ziektes optimaal te ondersteunen en (de ernst van) infecties te verminderen.</p> <p>Om resultaten zo effectief mogelijk te benutten voor verduurzaming binnen de varkenshouderij is het niet alleen essentieel om naar de effectiviteit van deze voeradditieven en voer(productie)strategieën te kijken, maar zeker ook om hun werkingsmechanisme te begrijpen. Het doel is hiermee om de natuurlijke weerstand van het dier ondersteunen, en E. coli en S. suis infecties te verminderen.</p> <p>Uiteindelijke doel: Vermindering van biggensterfte en een lager gebruik van antibiotica en mineralen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale <b>5.1 lid2h</b>. Hiermee wordt gezondheid en welzijn van varkens en daarmee de duurzaamheid ondersteund, wordt antibioticum gebruik en uitscheiding van mineralen in het milieu verminderd.</p> <p>Hieronder vallen drie subdoelen: het testen van de effectiviteit van voer(productie)strategieën en/of voeradditieven bij biggen (en hun zeugen) op:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door E. coli kolonisatie in biggen</li><li>• het verminderen van (de ernst van) ziekte door S. suis kolonisatie in biggen</li><li>• de immuun competentie van gespeende biggen</li></ul>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat. Wetenschappelijk belang Het wetenschappelijk belang is het verkrijgen van inzicht in de interacties tussen voeding, gezondheid en het microbioom (o.a. in de darmen en tonsillen). Daarmee kan inzicht verkregen worden in de manier waarop voeradditieven en/of voer(productie)strategieën bijdragen aan de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen infectieuze ziektes.</p> <p>Maatschappelijk belang E. coli en S. suis infecties zijn verantwoordelijk voor het grootste deel van het antibioticagebruik en sterfte bij gespeende biggen (GD Deventer, 2018). Deze infecties kunnen tot ernstige ziekteverschijnselen leiden, waaronder o.a. hevige uitdroging (E. coli), bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (S. suis). Door het ontwikkelen van effectieve voeradditieven en voer(productie)strategieën zal de darmgezondheid en weerbaarheid van varkens tegen ziektes verbeterd worden, waardoor de kans op infectie (en daarmee sterfte) wordt verkleind en het welzijn van de dieren wordt verbeterd. Door de weerbaarheid van varkens te verbeteren zullen dieren minder snel ziek worden en korter of minder ernstig ziek zijn. Hierdoor kan ook het antibiotica, zink en koper gebruik in de varkenshouderij omlaag, en is de milieubelasting lager. Dit is van belang voor een efficiënte en veilige voedselproductie (verminderen antibioticaresistenties). Als er bovendien minder dieren besmet worden met S. suis, is ook het risico kleiner dat deze bacterie overgedragen wordt op de mens (S. suis is een zoönose) en vervolgens tot ziekte in de mens leidt. Samengevat heeft dit project maatschappelijk belang voor de biggen, het milieu, de consumenten en, bijkomend, voor de economie.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC initieel advies C7. Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij 5.1 lid2h acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen.</p> <p>Citaat aanvullend DEC advies, pagina 2. (...) 3. Het viel de DEC op dat er gebrek was aan focus. Door voeding is het microbioom te beïnvloeden, daar is geen geforceerde infectie</p>

(infectieproef) voor nodig. In het project worden biggen overgelegd van de ene naar de andere zeug en er wordt antibiotica toegediend. Deze beide interventies verstoren het microbioom. Wanneer er antibiotica aan een dragende zeug wordt toegediend, heeft dit invloed op het microbioom van zowel de zeug als de biggen die later geboren worden.

4. De DEC heeft twijfels of het gekozen model geschikt is om een gezondheids/welzijnsclaim aan te tonen. De DEC is wel van mening dat er een verschuiving kan plaatsvinden van het darmmicrobiom d.m.v. voeding, waardoor mogelijk een verminderd risico op kolonisatie ontstaat, maar is er niet van overtuigd dat dit zal bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. De verschillende additieven die de onderzoeker wil testen zullen best een verschuiving in het microbiom teweeg brengen, maar hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren vormen tevens dominante risico's op het ontstaan van ziekte. In experimenten waar deze risico's als representatief voor de gangbare situatie "in het veld" worden geadresseerd, impliceert niet alleen een acceptatie van de huidige intensieve veehouderij, maar zet ook in op verdere intensivering.

5. Het is voor de DEC niet helder wat de bijdrage zal zijn van een infectieproef aan het vinden van een antwoord op de onderzoeksvraag. De onderzoeker heeft de DEC niet kunnen overtuigen van de relevantie hiervan.

Citaat aanvullend advies pagina 3, alinea 5 (dit is een minderheidsstandpunt).

Er treedt nu echter een verschuiving op, omdat de voederonderzoeksinstituten infectieproeven gaan uitvoeren, waardoor het ongerief verschuift van licht naar matig. Voor sommige DEC leden wordt hiermee een grens overschreden, omdat de huisvesting vaak niet helemaal op Wod is ingericht en omdat de kennis om goede infectieproeven uit te voeren minimaal aanwezig is. Corebusiness voor voedingsinstituten is voederonderzoek en volgens sommige DEC leden lijkt het door het toevoegen van infectieproeven PR motieven mogelijk meer prevaleren dan wetenschappelijke motieven.

5.2 lid1

### 3V's

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>Om uitspraken te kunnen doen over het effect van voerstrategieën bij zeugen en hun biggen op speendiarree veroorzaakt door E. coli is het noodzakelijk dat dit project met de zeug en haar biggen (de doeldieren) wordt uitgevoerd. Varkens in de leeftijdscategorie gespeende biggen zijn met name gevoelig voor infecties door E. coli. De darmkolonisatie van biggen kan vanaf jonge leeftijd reeds beïnvloedt worden, waardoor het ook zeer zinvol is om ook voerstrategieën bij zeugen te testen, voordat de biggen geboren worden of wanneer ze melk drinken. Er is geen diervrije vervanging beschikbaar, zoals computersimulaties of in vitro onderzoeken, want deze geven geen inzicht in de fysiologie van de dieren, en in relaties tussen de gastheer (het varken) en gastheer-microben (waaronder de E. coli bacteriën). In in vitro onderzoek ontbreekt de link van epitheelcellen met het immuun- en neurale systeem, waardoor het minder goed in staat is om de interactie tussen deze systemen te bestuderen. Ook kunnen in vitro studies de relatie tussen voeding van de zeug en latere reactie van biggen op besmetting met E. coli niet vervangen.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> zie 3.4.3.1.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd. Tijdens het ontwikkelen van de E. coli kolonisatie test is met behulp van een 'blanco groep' (negatieve controle welke geen E. coli inoculatie maar PBS inoculatie ondergaat) gebleken dat dieren welke niet met E. coli geïnoculeerd worden consistent lagere hoeveelheden E. coli uitscheiden in de mest dan biggen die wel met E. coli geïnoculeerd worden. In het huidige model geeft zo'n blanco groep veelal geen additionele informatie meer en wordt deze groep weggelaten. In de E. coli kolonisatie test zijn minder (proef)dieren nodig dan wanneer observationeel onderzoek zou worden uitgevoerd, vanwege lagere variatie tussen dieren. In een observationele studie valt niet te voorspellen welke dieren en wanneer ze geïnfecteerd raken. Bovendien kan de infectiedruk te hoog of te laag zijn in een observationele studie en is het niet mogelijk om de oorzaak van de klinische symptomen gedetailleerd in beeld te brengen, waardoor de haalbaarheid van de proef aanzienlijk verminderd wordt.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1.</p>
	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De onderzoeksopzet is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die gevonden zijn in voorgaande proeven op <sup>5.1 (a2)</sup> en in de literatuur. Deze gegevens worden gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel- en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier. Het dier wordt dan als zijn eigen controle gebruikt, waardoor het aantal dieren wordt geminimaliseerd.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen:</b> Citaat.</p> <p>De E. coli kolonisatie test zal worden uitgevoerd met een mild pathogene stam van E. coli bacteriën. Hierbij wordt er een duidelijke en consistente kolonisatie van de geïnoculeerde bacterie gevonden, maar met zo min mogelijk klinische ziekteverschijnselen. De E. coli bacteriën worden oraal met een spuitje in de bek gespoten. In incidentele gevallen, wanneer het dier de vloeistof niet opneemt, wordt een slangetje tot in de keelholte gebruikt. Er wordt geen maagsonde o.i.d. gebruikt. Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen:</b> Zie 3.4.3.1., additioneel:</p> <p>Naast het verminderen van het aantal onrustmomenten, wordt het verzamelen van mest vaak gecombineerd met het wegen van de dieren of het verzamelen van bloed, omdat tijdens deze handelingen de varkens vaak spontaan al gaan mesten, waardoor er geen rectale stimulatie nodig is om mest te verkrijgen. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen.</p>



	<p><b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen:</b> Citaat.</p> <p>De LPS immuun competentie test zal worden uitgevoerd met een lage LPS dosering. De dieren worden tweemaal geïnjecteerd, omdat (een deel van) de dieren al eerder in hun leven met LPS in aanraking gekomen kunnen zijn, bijvoorbeeld via E. coli bacteriën. De dieren kunnen hierdoor verschillend reageren op de injectie. Om de individuele variatie te verkleinen wordt tweemaal een injectie verricht, waardoor meer gegevens beschikbaar zijn van de dieren. Hierdoor kan beter onderscheid gemaakt worden tussen het individuele diereffect en het effect van het voeradditief of de voer(productie)strategie. Zo kan het model worden uitgevoerd met minder dieren. Er wordt de voorkeur gegeven aan tweemaal lage dosering van LPS dan een eenmalige hoge dosering, om het risico op ernstigere of langdurigere ziekteverschijnselen van de dieren te beperken.</p> <p>Wanneer de varkens geëuthanaseerd worden, worden de bloedmonsters tijdens euthanasie genomen. Niet-invasieve meetmethoden zijn gekozen waar mogelijk, en metingen zullen gecombineerd worden waar mogelijk om het aantal onrust momenten voor de dieren zo laag mogelijk te houden. Speekselmonsters worden genomen door varkens vrijwillig te laten kauwen op wattenstaafjes of touwen. Waarnemingen in rectale swabs, bloed-, speeksel-, en mestmonsters bieden de mogelijkheid om over de tijd metingen te verrichten aan hetzelfde dier op een niet-invasieve manier.</p>
--	---

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen: Citaat.	Zeugen doorlopen meerdere cycli in hun leven. Bij het indelen van de proef wordt gekeken naar de gezondheid en productiviteit van de zeug. Hergebruik bij zeugen zal ingezet worden in overeenstemming met de vier voorwaarden (a t/m d) onder artikel 1e van de WOD. Aangezien het merendeel van de proeven in de lactatie plaatsvindt zal er over het algemeen ongeveer 18 weken tussen de monsternames van de verschillende proeven zitten.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen: Zie 3.4.3.1.	
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen: zie 3.4.3.1.	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Het effect van voerstrategieën op E. coli kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-2%	<p>Citaat. (...) Milde symptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Verminderde gewichtstoename</li> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> </ul> <p>Bij milde symptomen zonder dat één van de onderstaande matige of ernstige symptomen voor het maximale aantal waarnemingen optreedt zal het dier in de proef blijven.</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Matige uitdrogingsverschijnselen, zoals een rimpelige huid</li> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Big trilt en biggen liggen op/tegen elkaar</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts</li> <li>o Overgeven</li> </ul> <p>Bij het optreden van matige symptomen zal de huid turgor en slijmvliezen gecontroleerd worden. Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en</p>

		<p>ter sectie aangeboden.</p> <p>* Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan E. coli gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Rectale temperatuur &lt;39 °C</li> <li>o Ernstige uitdrogingsverschijnselen, zoals een verlaagde huid turgor (huidplooi blijft staan) of diep ingevallen ogen</li> <li>o Afwijkende kleur van de slijmvliezen</li> <li>o Bloederige diarree</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 63,0% Matig 37,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Het effect van voerstrategieën op S. suis kolonisatie in biggen</b>	HEP: 0-3%	<p>Citaat. (...)</p> <p>Matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Trage reactie van een big</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40°C (*)</li> <li>o Verhoogde ademhaling (&gt;50 per min.), meestal als gevolg van koorts.</li> <li>o Zichtbare kreupelheid aan 1 poot waarbij de gewrichten niet gezwollen zijn en het dier deze nog wil belasten</li> </ul> <p>Bij 2 waarnemingen van matige symptomen zonder verbetering van de gezondheidsstatus zal de big uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>

		<p>*Uitzondering: bij 2 of meer waarnemingen van een rectale temperatuur &gt;40°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big alleen uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander matig symptoom van toepassing is. Het dier zal ook uit de proef gehaald worden wanneer het dier drie dagen achter elkaar een lichaamstemperatuur van <math>\geq 40.5^{\circ}\text{C}</math> heeft en verder geen andere ziekteverschijnselen heeft.</p> <p>Ernstige symptomen, waaronder ook symptomen die niet aan S. suis gerelateerd zijn:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet of nauwelijks aan te sporen tot eten, drinken en/of beweging</li> <li>o Duidelijke symptomen van hersenverschijnselen die wijzen op meningitis, zoals</li> <li>o Evenwichtsstoornissen</li> <li>o Slechte coördinatie</li> <li>o Kopschudden,</li> <li>o Op 1 zijde liggen,</li> <li>o Snelle oogbewegingen,</li> <li>o Gestrekte nek, opisthotonus</li> <li>o Duidelijke symptomen van sepsis, zoals de combinatie van een rectale temperatuur &gt;40°C en niet aan te sporen tot beweging.</li> <li>o Wanneer de big niet kan opstaan, plat blijft liggen</li> <li>o Ernstige kreupelheid aan 1 of meer gewrichten waarbij het gewricht zichtbaar gezwollen is en het dier deze niet meer wil belasten / niet meer wilt lopen (arthritis / poly-arthritis)</li> <li>o Kortademigheid, symptomen van bronchopneumonie</li> </ul> <p>De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden.</p>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 59,0% Matig 41,0% Licht	

<b>3.4.3.3 Het effect van voerstrategieën op de immuun competentie van biggen</b>	HEP: 0-1%	Citaat. (...) Milde tot matige symptomen, waarbij de big wel aan te sporen is tot eten, drinken en beweging: <ul style="list-style-type: none"> <li>o Verminderde activiteit, maar wel alert ("Quite, alert and responsive")</li> <li>o Verminderde voeropname</li> <li>o Rectale temperatuur &gt;40.5°C</li> <li>o (Waterdunne) Diarree</li> <li>o Speekselen</li> </ul> Bij 2 waarnemingen van een rectale temperatuur >41°C zonder verbetering van de gezondheidsstatus (ofwel daling in de temperatuur) zal een big uit de proef worden gehaald wanneer ook minimaal één ander mild tot matig symptoom van toepassing is. Wanneer de biggen de dag na de LPS injectie nog een verhoogde lichaamstemperatuur hebben (>40.5°C) en te weinig eten en drinken, zal in overleg met de dierenarts een behandeling worden opgesteld om de ontstekingsreactie / effecten van de LPS toediening tegen te gaan (indien nodig pijnstilling/ontstekingsremming). Wanneer een dier niet binnen een dag reageert op de behandeling van de dierenarts, zal het dier geëuthanaseerd worden.  Ernstige symptomen: <ul style="list-style-type: none"> <li>o Big is niet aan te sporen tot eten en drinken</li> <li>o Wanneer de big niet wil opstaan, plat blijft liggen</li> </ul> De big zal bij ernstige symptomen meteen uit de proef worden gehaald en worden geëuthanaseerd en ter sectie aangeboden
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Ongerief: 57,0% Matig 43,0% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

. De aanvraag is een  
vervolg op de projectvergunning AVDXXXXX5.1 lid2h. Er zijn vragen gesteld aan de aanvrager over de opbrengsten van de voorgaande projectvergunning, huisvesting, hergebruik, humane eindpunten, onderbouwing van de gevraagde aantallen en de NTS. De reactie van de aanvrager op deze vragen staat in 'AVD202114588g\_Beantwoording\_vragen\_CCD' en is met groene

tekst in de stukken aangegeven.

De huisvesting voldoet niet aan bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De huisvesting wijkt af van de eisen van de Wod omtrent eetbare hokverrijking, ook zullen de dieren geen strooisel krijgen. De DEC en het Secretariaat achten de ze afwijking voldoen de onderbouwd.

Er zal sprake zijn van hergebruik, de gebruikte zeugen doorlopen meerdere cycli. De aanvrager heeft aangegeven dat rekening zal worden gehouden met de wettelijke eisen omtrent hergebruik.

Dieren zullen tijdens bloedafnames geen pijnstilling krijgen. In de ogen van het Secretariaat is dit niet noodzakelijk en voldoende onderbouwd.

Het initiële DEC advies was niet goed navolgbaar, daarom is de DEC gevraagd om aanvullend advies uit te brengen, zie 'AVD202114588e2\_Aanvulling DEC advies'. Deze aanvullingen hebben echter nieuwe vragen opgeroepen. In haar aanvullende advies geeft de DEC aan bedenkingen te hebben bij de opzet van het project, de haalbaarheid van de doelstellingen, de relevantie van geforceerde infectieproeven voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen en de opbrengsten van het project.

Het project richt zich op voeding voor dieren in de veehouderij. Het ethische dilemma rondom de veehouderij geldt ook voor dit project. Hoewel in de intensieve veehouderij de gezondheid van de dieren onder druk staat, richt dit project zich op het ontwikkelen van dieet en voederstrategieën om de weerbaarheid van biggen tegen *e. suis* en *e. coli* te bevorderen. Voor de dieren is er sprake van licht tot matig ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten naast economische en wetenschappelijke aspecten ook een verbetering van gezondheid (welzijn) van doeldieren en duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu.

De aanvrager heeft middels opbrengsten van de eerdere projectvergunning aannemelijk gemaakt dat voerstrategieën effect kunnen hebben op *s. suis* en *e. coli* concentraties in het spijsverteringskanaal en de immuun respons van biggen. De DEC is er echter niet van overtuigd dat deze effecten dusdanig groot zijn dat deze zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid van de dieren. Derhalve verwacht de DEC niet dat de beoogde infectieproeven zullen bijdragen aan een het welzijn van doeldieren en/of een transitie naar een duurzame veehouderij. Ook geeft de DEC aan dat klinische streptokokkeninfecties vaak samenhangen met het vroeg en abrupt spenen van biggen en dat hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren tevens grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van ziekte onder biggen.

5.2 lid1

A large rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill. The redaction covers the majority of the page's content.

**6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

A rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill, located below the section header for item 6.

**7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

Het uitgangspunt van de Wet op de dierproeven (hierna Wod) is dat dieren een intrinsieke waarde hebben die moet worden gerespecteerd en dat dierproeven niet mogen worden uitgevoerd als de doelstelling 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 (artikel 10, eerste lid, onder a Wod). Daarnaast mogen dierproeven niet worden uitgevoerd als het belang van de doelstelling niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend (Wod artikel 10, eerste lid, onder c). Bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen voor dierproeven, dienen wij daarom een schade-baten analyse uit te voeren (artikel 10a2, tweede lid, onder d Wod) waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachten resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Vervolgens worden deze schade en baten gewaardeerd en tegen elkaar afgewogen. Bij de schade-baten analyse wordt niet alleen bovengenoemde weging van belangen betrokken, maar ook factoren als de 3V's (vervanging, vermindering en verfijning), ongerief, en de haalbaarheid van de doelstellingen.

In het licht van de maatschappelijke discussie omtrent intensieve veehouderij en het feit dat wij ons bij de beoordeling van dierproeven ten behoeve van de veehouderij regelmatig voor dilemma's geplaatst voelen, hebben wij de raad van Dieraangelegenheden gevraagd om een zienswijze betreffende het proefdiergebruik voor de intensieve veehouderij. Op basis van deze zienswijze hebben wij in 2019 ons uitvoeringsbeleid vergunningsaanvragen veehouderij gepubliceerd, aan de hand waarvan wij de schade en baten analyse bij vergunningsaanvragen ten behoeve van de veehouderij uitvoeren.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, achten wij het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij. Aan een economisch belang kennen wij om die reden een beperkt belang toe. Daarnaast vinden wij het van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waarderen wij om die reden dan ook als een beperkt belang. Bovendien vinden wij het van belang dat voor aanvragen die enkel gericht zijn op symptoombestrijding van belang dat het ongerief dat de dieren ondergaan niet hoger is dan licht ongerief.

#### *De aanvraag voldoet niet aan de wettelijke eisen omtrent verfijning*

De DEC heeft in haar advies te kennen gegeven niet overtuigd te zijn van de relevantie van het gekozen model. In de ogen van de DEC is een geforceerde infectie niet noodzakelijk om het de invloed van voeding op het microbioom te onderzoeken, deze effecten zullen ook optreden zonder een geforceerde infectie. Ook trekt de DEC aan dat de relevantie in twijfel van het toedienen van antibiotica en overleggen van biggen tussen zeugen, omdat deze handelingen een versturende werking hebben op het microbioom van de biggen. De proeven zijn ontworpen om variatie zoveel mogelijk te beperken en zo kleine voedingseffecten op het microbioom te kunnen meten. Het is echter onwaarschijnlijk dat minimale verschuivingen in het microbioom zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. In de ogen van de DEC is het daarom onwaarschijnlijk dat de bevindingen van uw project in de praktijk significant zullen bijdragen aan een betere diergezondheid of een duurzame veehouderij. Daar komt bovenop dat de bovengenoemde handelingen het ongerief voor de proefdieren verhogen ten opzichte van conventionele voederproeven. 5.2 lid 1

Daar komt bij dat deze handelingen zullen het ongerief voor de proefdieren zullen verhogen ten opzichte van conventionele voederproeven. De Wod stelt dat een dierproef dient te worden gekozen die naar verwachting bevredigende resultaten oplevert en de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade oplevert. Daarnaast zijn wOp basis van het bovenstaande zijn wij van oordeel dat het gekozen model niet geschikt is voor het behalen van de

**Met opmerkingen 5.1 lid2e (1):** Dat naast de algemene schade baten analyse die je zo mooi hiervoor hebt beschreven

**Met opmerkingen 5.1 lid2e (2):** Volgt dat uit het uitvoeringsbeleid of is dit een aanvullend standpunt van de CCD?

**Met opmerkingen 5.11(3R2):** Deze hele sectie is afkomstig uit het uitvoeringsbeleid

**Met opmerkingen 5.1 lid2e (4):** Volgt dit ook uit het uitvoeringsbeleid? Mocht dat zo zijn dan zou ik het opnemen. Het geeft nl een mooie onderbouwing van de opvatting

**Met opmerkingen 5.11(5R4):** inderdaad

**Met opmerkingen [HmM(6):** Motiveert de DEC nog waarom dat voor hun belangrijk is? Zie op hieronder

**Met opmerkingen 5.11(7R6):**

**Met opmerkingen 5.11(8R6):** Dat is belangrijk, omdat de gekozen strategie (standaardiseren dmv atibiotica en omleggen van biggen) niet geschikt is voor het aantonen van effecten die relevant zullen zijn in de praktijk.

**Met opmerkingen 5.1 lid2e (9):** In relatie met bovenstaande opm kun je nog terugrijpen naar het algemene kader (schade baten analyse en het meer specifieke afwegingskade van het uitvoeringsbeleid. Conclusie is dus ws schade baten analyse valt negatief uit. De voordelen voor de veehouderij tov de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren is volgens ons niet te rechtvaardigen. Als er meer argumenten uit de schade baten analyse meespelen zou ik ze ook opnemen.

Kunnen we daarnaast nog terugrijpen naar het uitvoeringsbeleid. Bi voorkeur een duidelijke bepaling, artikel onderwerp op grond waarvan we deze aanvraag afwijzen.

Je kunt het ook meer algemeen houden en aangeven dat schade baten analyse negatief uit. Valt en



diergezondheids- of duurzaamheidsdoelstellingen en leidt tot onnodig veel ongerief voor de proefdieren. Dit betekent dat het project in strijd is met artikel 10, lid 2, onder c, van de Wod.

#### *Schade-baten analyse*

In uw aanvraag onderscheiden wij de volgende belangen. De proefdieren die schade ondervinden door de experimentele handelingen en hierdoor licht of matig ongerief ondergaan. Dit waarden wij als een substantieel belang van hoge morele waarde.

Hier tegenover staande potentiële baten van het project. Zo hebben de onderzoekers een wetenschappelijk belang bij het project, waaraan wij conform het DEC advies een beperkte morele waarde toekennen. Ook is er een economisch belang voor fabrikanten van veevoerders, aan dit belang kennen wij conform ons uitvoeringsbeleid een beperkte waarde toe.

Tot slot zijn er de mogelijke positieve lange termijn effecten van het project voor de doeldieren (verhoogd welzijn), maatschappij en het milieu (minder belastende additieven en antibiotica). Deze opbrengsten zijn echter afhankelijk van de uitkomsten van de proeven. In haar advies geeft de DEC aan te twifelen aan de haalbaarheid van de doelstellingen van uw project en de omvang van de mogelijke gezondheidseffecten. Zo is de DEC niet overtuigd van de relevantie van het gekozen model, omdat niet duidelijk is hoe een geforceerde infectie zich verhoudt tot het infectieverloop in de praktijk. Ook geeft de DEC aan dat het toedienen van antibiotica en overleggen van biggen tussen zeugen op zichzelf al een versturende werking hebben op het microbiom. De proeven zijn ontworpen om variatie zoveel mogelijk te beperken en zo kleine voedingseffecten op het microbiom te kunnen meten. Het is echter onwaarschijnlijk dat minimale verschuivingen in het microbiom zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. In de ogen van de DEC is het daarom onwaarschijnlijk dat de bevindingen van uw project representatief zijn voor de praktische situatie en significant zullen bijdragen aan een betere diergezondheid of een duurzame veehouderij. ~~In de ogen van de DEC is het daarom onwaarschijnlijk dat de bevindingen van uw project representatief zijn voor de praktische situatie en bevindingen significant zullen bijdragen aan een betere diergezondheid of een duurzame veehouderij.~~ Op basis van uw projectaanvraag en uw reactie op onze vragen hebt u aannemelijk gemaakt dat voer(productie)strategieën en voeradditieven kunnen zorgen voor verschuivingen in het microbiom en invloed kunnen uitoefenen op de immuunrespons. In onze ogen hebt u hiermee echter niet aangetoond dat deze effecten ook daadwerkelijk leiden tot een verminderde ziektegevoeligheid bij de doeldieren. Wij delen daarom de twijfels van de DEC over de uiteindelijk welzijns- en duurzaamheidsopbrengsten van uw project en waarden deze belangen als een beperkt en onzeker toekomstig resultaat.

Door de beperkte omvang van de dierenwelzijns- en duurzaamheidsopbrengsten en de onzekerheid omtrent het behalen deze doelstellingen zijn wij, anders dan de meerderheid van DEC, van oordeel dat de belangen van proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de doeldieren, onderzoekers, veevoederfabrikanten, maatschappij en het milieu. Dit betekent dat het op grond van artikel 10, lid 1, onder c, van de Wod niet is toegestaan om de dierproef uit te voeren.

#### *Doelstellingen rechtvaardigen geen matig ongerief*

Tot slot heeft de DEC in haar advies te kennen gegeven dat klinische streptokokkeninfecties bij biggen sterk samenhangen met het vroeg en abrupt spenen van biggen in de huidige veehouderij en dat hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren tevens grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van ziekte. Wij onderkennen het belang van goede voeding voor de weerbaarheid van landbouwhuisdieren, maar de invloed van voeding kan niet los worden gezien van de omstandigheden waarin het dier gehouden wordt. Om deze reden oordelen wij dat uw proeven zich grotendeels richten op het bestrijden van symptomen veroorzaakt worden door het veehouderij systeem. In ons uitvoeringsbeleid hebben wij te kennen gegeven dat wij het van belang achten dat het ongerief dat de dieren ondergaan bij onderzoek naar symptoombestrijding niet hoger is dan licht. Wij daarom van oordeel dat de projectdoelstellingen het matige ongerief voor een deel van de proefdieren niet rechtvaardigen.

**Met opmerkingen 6.11102e (10):** Motiveert de DEC nog waarom dat voor hun belangrijk is? Zie opm hieronder

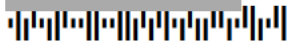
**Met opmerkingen 6.11111R10):**

**Met opmerkingen 6.11112R10):** Dat is belangrijk, omdat de gekozen strategie (standaardiseren dmv atibibiotica en omleggen van biggen) niet geschikt is voor het aantonen van effecten die relevant zullen zijn in de praktijk.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h  
5.1 lid2e  
5.1 lid2h



**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  
AVD 5.1 lid2h 202114588  
**Bijlagen**  
2

Datum 27 juli 2021  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 25 februari 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114588. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij wijzen uw aanvraag af. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) niet is toegestaan het project "Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen." te starten.

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

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 mei 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

*Nadere vragen aanvrager*

Op 3 juni 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de mogelijke opbrengsten van het project, hergebruik, huisvesting, berekening van het aantal dieren, humane eindpunten en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Overwegingen**

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Het advies van de DEC is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. In onze ogen is de beantwoording van de centrale morele vraag niet in lijn met de conclusies van de DEC uit de beoordelingsvragen.

**Datum:**

27 juli 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD **S.1 lid2h** 202114588

Het uitgangspunt van de Wet op de dierproeven (hierna Wod) is dat dieren een intrinsieke waarde hebben die moet worden gerespecteerd en dat dierproeven niet mogen worden uitgevoerd als de doelstelling 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 (artikel 10, eerste lid, onder a Wod). Daarnaast mogen dierproeven niet worden uitgevoerd als het belang van de doelstelling niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend (artikel 10, eerste lid, onder c Wod). Bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen voor dierproeven, dienen wij daarom een schade-baten analyse uit te voeren (artikel 10a2, tweede lid, onder d Wod) waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachten resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Vervolgens worden deze schade en baten gewaardeerd en tegen elkaar afgewogen. Bij de schade-baten analyse wordt niet alleen bovengenoemde weging van belangen betrokken, maar ook factoren als de 3V's (vervanging, vermindering en verfijning), ongerief, en de haalbaarheid van de doelstellingen.

**Datum:**  
27 juli 2021  
**Aanvraagnummer:**  
AVC **5.1 lid2h** 02114588

In het licht van de maatschappelijke discussie omtrent intensieve veehouderij en het feit dat wij ons bij de beoordeling van dierproeven ten behoeve van de veehouderij regelmatig voor dilemma's geplaatst voelen, hebben wij de raad van Dieraangelegenheden gevraagd om een zienswijze betreffende het proefdiergebruik voor de intensieve veehouderij. Op basis van deze zienswijze hebben wij in 2019 ons uitvoeringsbeleid vergunningaanvragen veehouderij gepubliceerd, aan de hand waarvan wij de schade en baten analyse bij vergunningaanvragen ten behoeve van de veehouderij uitvoeren.

Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, achten wij het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij. Aan een economisch belang kennen wij om die reden een beperkt belang toe. Daarnaast vinden wij het van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waarderen wij om die reden dan ook als een beperkt belang. Bovendien vinden wij het van belang dat voor aanvragen die enkel gericht zijn op symptoombestrijding dat het ongerief dat de dieren ondergaan niet hoger is dan licht ongerief.

*De aanvraag voldoet niet aan de wettelijke eisen omtrent verfijning*

De DEC heeft in haar advies te kennen gegeven niet overtuigd te zijn van de



relevantie van het gekozen model. In de ogen van de DEC is een geforceerde infectie niet noodzakelijk om het de invloed van voeding op het microbiom te onderzoeken, deze effecten zullen ook optreden zonder een geforceerde infectie. Ook trekt de DEC de relevantie in twijfel van het toedienen van antibiotica en overleggen van biggen tussen zeugen, omdat deze handelingen een versturende werking hebben op het microbiom waardoor niet gesproken kan worden van een praktisch conforme situatie. Wij kunnen ons vinden in het oordeel van de DEC en zijn daarom niet overtuigd van de relevantie van de voorgestelde infectieproeven en bijbehorende handelingen voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. Daar komt bij dat deze handelingen het ongerief voor de proefdieren zullen verhogen ten opzichte van conventionele voederproeven. De Wod stelt dat een dierproef dient te worden gekozen die naar verwachting bevredigende resultaten oplevert en de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade oplevert. Op basis van het bovenstaande zijn wij van oordeel dat het gekozen model niet geschikt is voor het behalen van de diergezondheids- of duurzaamheidsdoelstellingen en leidt tot onnodig veel ongerief voor de proefdieren. Dit betekent dat het project in strijd is met artikel 10, lid 2, onder c, van de Wod.

**Datum:**  
27 juli 2021  
**Aanvraagnummer:**  
AVD **5.1 lid2h** 202114588

#### *Schade-baten analyse valt negatief uit*

In uw aanvraag onderscheiden wij de volgende belangen. De proefdieren die schade ondervinden door de experimentele handelingen en hierdoor licht of matig ongerief ondergaan. Dit waarderen wij als een substantieel belang van hoge morele waarde.

Hier tegenover staan de potentiële baten van het project. Zo hebben de onderzoekers een wetenschappelijk belang bij het project, waaraan wij conform het DEC advies een beperkte morele waarde toekennen. Ook is er een economisch belang voor fabrikanten van veevoerders, aan dit belang kennen wij conform ons uitvoeringsbeleid een beperkte waarde toe. Tot slot zijn er de mogelijke positieve lange termijn effecten van het project voor de doeldieren (verhoogd welzijn), maatschappij en het milieu (minder belastende additieven en antibiotica). Deze opbrengsten zijn echter afhankelijk van de uitkomsten van de proeven. In haar advies geeft de DEC aan te twifelen aan de haalbaarheid van de doelstellingen van uw project en de omvang van de mogelijke gezondheidseffecten. Zo is de DEC niet overtuigd van de relevantie van het gekozen model, omdat niet duidelijk is hoe een geforceerde infectie zich verhoudt tot het infectieverloop in de praktijk. Ook geeft de DEC aan dat het toedienen van antibiotica en overleggen van biggen tussen zeugen op zichzelf al een versturende werking hebben op het microbiom. De proeven zijn ontworpen om variantie zoveel mogelijk te beperken en zo kleine voedingseffecten op het microbiom te kunnen meten. Het is echter onwaarschijnlijk dat minimale verschuivingen in het microbiom zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. In de ogen van de DEC is het daarom onwaarschijnlijk dat de bevindingen van uw project

representatief zijn voor de praktijksituatie en significant zullen bijdragen aan een betere diergezondheid of een duurzame veehouderij. Op basis van uw projectaanvraag en uw reactie op onze vragen hebt u aannemelijk gemaakt dat voer(productie)strategieën en voeradditieven kunnen zorgen voor verschuivingen in het microbioom en invloed kunnen uitoefenen op de immuunrespons. In onze ogen hebt u hiermee echter niet aannemelijk gemaakt dat deze effecten ook daadwerkelijk leiden tot een verminderde ziektegevoeligheid bij de doeldieren. Wij delen daarom de twijfels van de DEC over de uiteindelijk welzijns- en duurzaamheidsopbrengsten van uw project en waarderen deze belangen als een beperkt en onzeker toekomstig resultaat.

**Datum:**  
27 juli 2021  
**Aanvraagnummer:**  
AVD **5.1 lid2h** 202114588

Door de beperkte omvang van de dierenwelzijns- en duurzaamheidsopbrengsten en de onzekerheid omtrent het behalen deze doelstellingen zijn wij, anders dan de meerderheid van DEC, van oordeel dat de belangen van proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de doeldieren, onderzoekers, veevoederfabrikanten, maatschappij en het milieu. Dit betekent dat het op grond van artikel 10, lid 1, onder c, van de Wod niet is toegestaan om de dierproef uit te voeren.

#### *Doelstellingen rechtvaardigen geen matig ongerief*

Tot slot heeft de DEC in haar advies te kennen gegeven dat klinische streptokokkeninfecties bij biggen sterk samenhangen met het vroeg en abrupt spenen van biggen in de huidige veehouderij en dat hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren tevens grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van ziekte. Wij onderkennen het belang van goede voeding voor de weerbaarheid van landbouwhuisdieren, maar de invloed van voeding kan niet los worden gezien van de omstandigheden waarin het dier gehouden wordt. Om deze reden oordelen wij dat uw proeven zich grotendeels richten op het bestrijden van symptomen die veroorzaakt worden door het veehouderij systeem. In ons uitvoeringsbeleid hebben wij te kennen gegeven dat wij het van belang achten dat het ongerief dat de dieren ondergaan bij onderzoek naar symptoombestrijding niet hoger is dan licht. Wij zijn daarom van oordeel dat de projectdoelstellingen het matige ongerief voor een deel van de proefdieren niet rechtvaardigen.

#### **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.

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.

**Datum:**  
27 juli 2021  
**Aanvraagnummer:**  
AVC **5.1 lid2h** 02114588

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto: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:

- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Aanvraagnummer: AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202114588

## Weergave wet- en regelgeving

### **Wet op de dierproeven, Artikel 10**

Lid 1. Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel

a. 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;

c. waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

Lid 2. Ingeval er verschillende mogelijkheden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt de dierproef geselecteerd die in de hoogste mate aan de volgende voorwaarden voldoet en naar verwachting bevredigende resultaten oplevert:

c. de desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade.

### **Wet op de dierproeven, Artikel 10a2**

Lid 2. De projectbeoordeling omvat in het bijzonder:

d. een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu;



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 21 oktober 2021 15:19  
**Aan:** 5.1 lid2f  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114588

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 25-02-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114588.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de mogelijke opbrengsten van het project, hergebruik, huisvesting, berekening van het aantal dieren, humane eindpunten en de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning af te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 27-7-2021.

Hieronder is de reden van afwijzen weergegeven:

Het uitgangspunt van de Wet op de dierproeven (hierna Wod) is dat dieren een intrinsieke waarde hebben die moet worden gerespecteerd en dat dierproeven niet mogen worden uitgevoerd als de doelstelling 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 (artikel 10, eerste lid, onder a Wod). Daarnaast mogen dierproeven niet worden uitgevoerd als het belang van de doelstelling niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend (artikel 10, eerste lid, onder c Wod). Bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen voor dierproeven, dienen wij daarom een schade-baten analyse uit te voeren (artikel 10a2, tweede lid, onder d Wod) waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachten resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Vervolgens worden deze schade en baten gewaardeerd en tegen elkaar afgewogen. Bij de schade-baten analyse wordt niet alleen bovengenoemde weging van belangen betrokken, maar ook factoren als de 3V's (vervanging, vermindering en verfijning), ongerief, en de haalbaarheid van de doelstellingen. In het licht van de maatschappelijke discussie omtrent intensieve veehouderij en het feit dat wij ons bij de beoordeling van dierproeven ten behoeve van de veehouderij regelmatig voor dilemma's geplaatst voelen, hebben wij de raad van Dieraangelegenheden gevraagd om een zienswijze betreffende het proefdiergebruik voor de intensieve veehouderij. Op basis van deze zienswijze hebben wij in 2019 ons uitvoeringsbeleid vergunningaanvragen veehouderij gepubliceerd, aan de hand waarvan wij de schade en baten analyse bij vergunningaanvragen ten behoeve van de veehouderij uitvoeren. Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, achten wij het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij. Aan een economisch belang kennen wij om die reden een beperkt belang toe. Daarnaast vinden wij het van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. Symptoombestrijding op zich waarderen wij om die reden dan ook als een beperkt belang. Bovendien vinden wij het van belang dat voor aanvragen die enkel gericht zijn op symptoombestrijding van belang dat het ongerief dat de dieren ondergaan niet hoger is dan licht ongerief. De aanvraag voldoet niet aan de wettelijke eisen omtrent verfijning. De DEC heeft in haar advies te kennen gegeven niet overtuigd te zijn van de relevantie van het gekozen model. In de ogen van de DEC is een geforceerde infectie niet noodzakelijk om het de invloed van voeding op het microbiom te onderzoeken, deze effecten zullen ook optreden zonder een geforceerde infectie. Ook trekt de DEC de relevantie in twijfel van het toedienen van antibiotica en overleggen van biggen tussen zeugen, omdat deze handelingen een versturende werking hebben op het microbiom waardoor niet gesproken kan worden van een

praktijk conforme situatie. Wij kunnen ons vinden in het oordeel van de DEC en zijn daarom niet overtuigd van de relevantie van de voorgestelde infectieproeven en bijbehorende handelingen voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. Daar komt bij dat deze handelingen het ongerief voor de proefdieren zullen verhogen ten opzichte van conventionele voederproeven. De Wod stelt dat een dierproef dient te worden gekozen die naar verwachting bevredigende resultaten oplevert en de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade oplevert. Op basis van het bovenstaande zijn wij van oordeel dat het gekozen model niet geschikt is voor het behalen van de diergezondheids- of duurzaamheidsdoelstellingen en leidt tot onnodig veel ongerief voor de proefdieren. Dit betekent dat het project in strijd is met artikel 10, lid 2, onder c, van de Wod. Schade-baten analyse In uw aanvraag onderscheiden wij de volgende belangen. De proefdieren die schade ondervinden door de experimentele handelingen en hierdoor licht of matig ongerief ondergaan. Dit waarden wij als een substantieel belang van hoge morele waarde. Hier tegenover staande potentiële baten van het project. Zo hebben de onderzoekers een wetenschappelijk belang bij het project, waaraan wij conform het DEC advies een beperkte morele waarde toekennen. Ook is er een economisch belang voor fabrikanten van veevoerders, aan dit belang kennen wij conform ons uitvoeringsbeleid een beperkte waarde toe. Tot slot zijn er de mogelijke positieve lange termijn effecten van het project voor de doeldieren (verhoogd welzijn), maatschappij en het milieu (minder belastende additieven en antibiotica). Deze opbrengsten zijn echter afhankelijk van de uitkomsten van de proeven. In haar advies geeft de DEC aan te twifelen aan de haalbaarheid van de doelstellingen van uw project en de omvang van de mogelijke gezondheidseffecten. Zo is de DEC niet overtuigd van de relevantie van het gekozen model, omdat niet duidelijk is hoe een geforceerde infectie zich verhoudt tot het infectieverloop in de praktijk. Ook geeft de DEC aan dat het toedienen van antibiotica en overleggen van biggen tussen zeugen op zichzelf al een versturende werking hebben op het microbiom. De proeven zijn ontworpen om variantie zoveel mogelijk te beperken en zo kleine voedingseffecten op het microbiom te kunnen meten. Het is echter onwaarschijnlijk dat minimale verschuivingen in het microbiom zullen bijdragen aan een verminderde ziektegevoeligheid. In de ogen van de DEC is het daarom onwaarschijnlijk dat de bevindingen van uw project representatief zijn voor de praktijksituatie en significant zullen bijdragen aan een betere diergezondheid of een duurzame veehouderij. Op basis van uw projectaanvraag en uw reactie op onze vragen hebt u aannemelijk gemaakt dat voer(productie)strategieën en voeradditieven kunnen zorgen voor verschuivingen in het microbiom en invloed kunnen uitoefenen op de immuunrespons. In onze ogen hebt u hiermee echter niet aangetoond dat deze effecten ook daadwerkelijk leiden tot een verminderde ziektegevoeligheid bij de doeldieren. Wij delen daarom de twijfels van de DEC over de uiteindelijk welzijns- en duurzaamheidsopbrengsten van uw project en waarden deze belangen als een beperkt en onzeker toekomstig resultaat. Door de beperkte omvang van de dierenwelzijns- en duurzaamheidsopbrengsten en de onzekerheid omtrent het behalen deze doelstellingen zijn wij, anders dan de meerderheid van DEC, van oordeel dat de belangen van proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de doeldieren, onderzoekers, veevoederfabrikanten, maatschappij en het milieu. Dit betekent dat het op grond van artikel 10, lid 1, onder c, van de Wod niet is toegestaan om de dierproef uit te voeren. Doelstellingen rechtvaardigen geen matig ongerief Tot slot heeft de DEC in haar advies te kennen gegeven dat klinische streptokokkeninfecties bij biggen sterk samenhangen met het vroeg en abrupt spenen van biggen in de huidige veehouderij en dat hygiëne, manier van huisvesting, en overige zoötechnische factoren tevens grote invloed hebben het al dan niet ontstaan van ziekte. Wij onderkennen het belang van goede voeding voor de weerbaarheid van landbouwhuisdieren, maar de invloed van voeding kan niet los worden gezien van de omstandigheden waarin het dier gehouden wordt. Om deze reden oordelen wij dat uw proeven zich grotendeels richten op het bestrijden van symptomen veroorzaakt worden door het veehouderij systeem. In ons uitvoeringsbeleid hebben wij te kennen gegeven dat wij het van belang achten dat het ongerief dat de dieren ondergaan bij onderzoek naar symptoombestrijding niet hoger is dan licht. Wij daarom van oordeel dat de projectdoelstellingen het matige ongerief voor een deel van de proefdieren niet rechtvaardigen.

Uw initiële advies bleek moeilijk navolgbaar, omdat veel vragen zijn gesteld en de overwegingen die tot uw conclusies hebben geleid niet altijd uit het advies naar voren kwamen. Ook was in de ethische afweging niet goed navolgbaar hoe de beantwoording van de centrale morele vraag tot een positief oordeel heeft kunnen leiden. Zo bleek uit de beantwoording van de centrale morele vraag dat u twijfels had over de opbrengsten van het project. Wanneer er initieel twijfels zijn (geweest) over aspecten van een aanvraag is het voor onze besluitvorming zeer waardevol om bij de beantwoording van de C vragen en centrale morele vraag inzicht te krijgen in de afwegingen die tot de uiteindelijke conclusie hebben geleid. Op de punten die voor ons niet goed navolgbaar waren hebben wij u om aanvullend advies verzocht. Uw aanvullingen op het initiële advies hebben veel belangrijke additionele informatie gegeven die cruciaal is

gebleken bij de beoordeling van het project. De inhoud van het aanvullende advies was in onze ogen echter niet in lijn met de positieve conclusie van uw initiële advies. Met name uw bedenkingen bij de gekozen strategie, relevantie van de infectieproeven, opbrengsten en haalbaarheid van de doelstellingen leken tegenstrijdig met het advies om het project te vergunnen. Tijdens telefonisch overleg wees u ons op get gegeven dat binnen de DEC discussies hebben plaatsgevonden over deze punten en het uiteindelijke positieve advies gebaseerd is op een meerderheidsstandpunt. Uiteindelijk hebben wij onze definitieve ethische afweging gebaseerd op alle beschikbare informatie vanuit de aanvrager, het initiële DEC advies en het aanvullende DEC advies. Deze afweging is negatief uitgevallen op gronden die u in de bovenstaande onderbouwing van onze afwijzing kunt nalezen. Wij waarderen al uw input en medewerking bij de behandeling van deze complexe projectaanvraag en hopen dat u zich kunt vinden in ons uiteindelijke oordeel. Tot slot herkennen wij het dilemma omtrent het afwijken van de Wod op gebied van huisvesting, om onderzoek te doen onder praktijknormen. Het is echter niet eenvoudig om hier eenduidige landelijke richtlijnen voor op te stellen, omdat de onderbouwing hiervoor per individuele casus kan verschillen. Ons standpunt ten aanzien van deze afwijkingen is 'neetenzij'. Het is voor ons van belang dat per afwijking een onderbouwing wordt gegeven voor de noodzaak van deze afwijking. De beoordeling van deze onderbouwing bepaalt of de afwijking wel of niet gerechtvaardigd is. In de ogen van de CCD kunnen gegronde wetenschappelijke- en/of welzijnsoverwegingen een afwijking van richtlijn 2010/63 /EU rechtvaardigen.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

5.1 lid2h

AANGETEKEND 5.1 lid2h  
 Centrale Commissie Dierproeven  
 Afdeling juridische zaken  
 Postbus 93118  
 2509 AC 'S-GRAVENHAGE

*Datum*  
 13 oktober 2021

*Onderwerp*  
 Aanvullend bezwaarschrift

*Ons zaaknummer*  
 5.1 lid2h

*Uw kenmerk*  
 AVD 5.1 lid2h 202114588

*Behandeld door*  
 5.1 lid2e

Vrijdag afwezig

5.1 lid2h, wonende aan de 5.1 lid2h, vroeg ons om juridische hulp.

**Voor cliënt maak ik bezwaar tegen uw besluit van 27 juli 2021 met kenmerk AVD 5.1 lid2h 202114588**

Cliënt is het niet eens met uw besluit om zijn aanvraag voor een projectvergunning dierproeven af te wijzen. Het gaat om het project "Het effect van voerstrategieën op het immuunsysteem en twee belangrijke infectieuze aandoeningen bij biggen." Hieronder licht ik de bezwaargronden van de cliënt nader toe.

#### **Bezwaargronden**

De Centrale Commissie Dierproeven (CCD) moet op grond van artikel 10a lid 3 een beslissing nemen na advies van een erkende Dierexperimentencommissie (DEC) en op grondslag van de artikelen 2, tweede en derde lid, 9, 10, 10a2, 10a4, 10b, 10d tot en met 10h, 11, 13 en 13f. De cliënt is van mening dat dit besluit ondeugdelijk is gemotiveerd en op grond van onjuiste informatie, interpretatie en gegevens onzorgvuldig tot stand is gekomen. De aanvraag voldoet volgens de cliënt wel aan de wettelijke eisen zoals gesteld in de wet op de dierproeven. Hieronder licht ik dit standpunt met behulp van de onderbouwde argumentatie van 5.1 lid2h nader toe.

5.1 lid2h



**1. De CCD kan zich niet vinden in de inhoud van het advies van de DEC, waarin de centrale morele vraag wordt beantwoord.**

Door de DEC is de centrale morele vraag als volgt geformuleerd (DEC-advies 14-05 2021):  
*"Rechtvaardigt het onderzoek naar de effectiviteit van bepaalde voerstrategieën, die de gezondheid en daarmee het welzijn van biggen kort na het spenen kunnen verbeteren en de belasting van het milieu doen verminderen het lichte ongerief voor 1230 en max. matig ongerief voor 1860 dieren?"*

In het DEC advies d.d. 14-05 2021 stelt de DEC dat zij niet op ethische bezwaren stuit voor deze vraag. Daarna is in de CCD beschikking van 27-7 2021 aangegeven dat de beantwoording van de centrale morele vraag niet in lijn is met de conclusies van de DEC uit de naderhand gestelde beoordelingsvragen.

In de beantwoording aan de CCD m.b.t. de centrale morele vraag stelt de DEC het volgende (d.d. 10-06 2021):

*"Er treedt nu echter een verschuiving op (voor wat betreft type onderzoek), omdat 5.1 lid2h infectieproeven gaan uitvoeren waardoor het ongerief verschuift van licht naar matig. Voor sommige DEC leden wordt hiermee een grens overschreden omdat de huisvesting niet helemaal op de Wod is ingericht en omdat de kennis om goede infectieproeven uit te voeren minimaal aanwezig is. Volgens sommige DEC leden lijkt het dat door het toevoegen van infectieproeven PR motieven mogelijk meer prevaleren dan wetenschappelijke motieven."*

De cliënt onderschrijft dit standpunt niet. Hieronder licht ik dit puntsgewijs nader toe.

**1.1. Verandering / verschuiving van type uitgevoerd onderzoek door 5.1 lid2h**

5.1 lid2h voert reeds meer dan 10 jaar infectieproeven uit om voedingsconcepten en -additieven te onderzoeken. Project aanvraag AVD 5.1 lid2h 20214588 is een vervolg aanvraag op het project AVL 5.1 lid2h onder welk in de afgelopen 5 jaar het zelfde type onderzoek is uitgevoerd. Voor wat betreft andere diersoorten worden reeds langer dan 10 jaar infectieproeven uitgevoerd bij 5.1 lid2h. Deze proeven zijn steeds door betreffende DEC beoordeeld en goedgekeurd. De resultaten die 5.1 lid2h behaald heeft met dit type onderzoek worden nationaal en internationaal gewaardeerd en ingezet door onderzoekers gespecialiseerd in "One Health" en antibioticaresistentie, waaronder microbiologen en experts op gebied van varkensgezondheid en darm- en zoönotische infecties (zie ook de bijgevoegde brief 1 van 5.1 lid2e). Naast opbrengsten op translationeel niveau wordt binnen dit project ook steeds nieuwe kennis opgedaan over het werkingsmechanisme van voerstrategieën en de



kolonisatie van ziekteverwekkers. Deze kennis wordt vervolgens benut in volgende onderzoeken en ook gedeeld met projectpartners.

### 1.2. Huisvesting van proefdieren

Alle dieren binnen de proeven van dit project worden gehouden volgens richtlijn 2010-63/EU van de Wod. Over de zeugen huisvesting is nader contact geweest: zie beantwoording vragen van de DEC (gesteld op 17-03 2021) en van de CCD (gesteld op 03-06 2021) tijdens de beoordelingsprocedure. Tijdens de looptijd van deze projectaanvraag is in overleg met de NVWA de hokverrijking reeds zo aangepast dat ook het eetbare aspect van de hokverrijking voldoet aan de richtlijn (gebruik van katoenen touw voor alle varkens in het project, zowel voor de zeugen, zogende biggen en gespeende biggen). De cliënt vindt het jammer dat er geen gebruik is gemaakt van de uitnodiging om op de faciliteiten te komen kijken (zie beantwoordingbrief aan DEC van 17-03 2021 en beantwoordingbrief aan CCD van 03-06 2021).

### 1.3. Kennis m.b.t. infectieproeven

<sup>5.1 lid2h</sup> wil bestrijden dat op <sup>5.1 lid2h</sup> onvoldoende kennis aanwezig is om kwalitatief hoogwaardige infectieproeven uit te voeren. <sup>5.1 lid2h</sup> werkt samen met (inter)nationale universiteiten binnen het <sup>5.1 lid2h</sup> project omtrent *S. suis* (<sup>5.1 lid2h</sup> <sup>5.1 lid2h</sup>) en het EU project genaamd <sup>5.1 lid2h</sup> <sup>5.1 lid2h</sup> omtrent *E. coli*. Eigen onderzoekers publiceren resultaten van de infectieproeven in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften en delen resultaten door middel van presentaties op congressen. Dit toont duidelijk de wetenschappelijke motieven van <sup>5.1 lid2h</sup>. Alle certificaten benodigd voor uitvoering van dierproeven zijn geborgd binnen het bedrijf en wetenschappers vanuit verschillende specialisaties op het gebied van voeding en gezondheid zijn werkzaam binnen <sup>5.1 lid2h</sup>.

Daarnaast spreekt de DEC zichzelf tegen in haar beantwoordingbrief aan de CCD d.d. 10-06 2021 voor wat betreft haar mening over de kennis en kunde van <sup>5.1 lid2h</sup> ten opzichte van haar advies d.d. 14-05 2021: "Afgaande op de oorspronkelijke aanvraag en de ervaring met voedingsonderzoek aanwezig bij <sup>5.1 lid2h</sup> acht een deel van de DEC de kennis en kunde voldoende gewaarborgd, maar een ander deel van de DEC had twijfels over de competenties. Onder meer om hier meer duidelijkheid over te krijgen heeft de DEC een relatief groot aantal vragen aan de aanvragers voorgelegd, zie ook A9. De bestaande twijfels zijn hiermee weggenomen."

Op basis van het eerste advies is de conclusie van de DEC dat zij de kennis en kunde van het <sup>5.1 lid2h</sup> gewaarborgd acht.