

	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.</p> <p>Piglets will be housed in groups of 3. In case 1 piglet needs to be removed (Humane End Point) or dies, piglets are still with 2 in a pen. If a second piglets needs to be removed or dies, the remaining piglet will be removed from the study and housed with other piglets in a separate barn.</p> <p>In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).</p> <p>Animals will be checked twice daily by trained staff after the E. coli challenge at least until the trained staff member indicates that there are no further health issues observed. The animals will then be checked once daily again.</p> <p>Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing. Piglets will be weighed before the E. coli inoculum is given. When a piglet has lost too much body weight or is in poor health before the E. coli challenge, the piglet is removed from the study and transferred to a standard housing pen at the same facility.</p>
	<p><b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:</b> Citaat.</p> <p>Piglets are the target animals. Using other animals (mice, rats) as a model will not result in less discomfort to an individual. In addition, protein deposition is species specific. Therefore, the experimental treatments should be tested in the target animal directly. Pigs will receive non-edible enrichment material to reduce stress and expression of abnormal behaviour. Pigs are closely followed to check health and welfare issues during the experiments, with both being documented daily and medical treatments will be applied if necessary. Nitrogen efficiency will be measured indirectly using total collection of faeces and urine to reduce discomfort. Pigs are social animals and will be housed in groups for the first two weeks. Period and number of pigs that need to be housed individually are limited as much as possible. When housed individually nose to nose contact is still possible. Pigs are housed in pens specially designed for individual housing with floor heating ensuring the temperature is within the thermoneutral zone. Blood sampling will be performed by trained personnel.</p> <p>We will do whatever is possible to adapt piglets to human handling prior to the start of the experiment in order to refine the procedure of attaching the stoma bags.</p>

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Nutrient utilization model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Management model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 E. coli challenge model	Nee	
3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions	Nee	

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Nutrient utilization model</b>	HEP: Worden niet verwacht	
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Management model</b>	HEP: Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.	Citaat. No recovery from respiratory distress. In that case, the animal will be removed from the study and transferred to standard housing if possible or humanely euthanized. An animal will also be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
<b>3.4.3.3 E. coli challenge model</b>	HEP: 3%	1 Body weight loss before the E. coli challenge. Dehydration after the E. coli challenge by visual examination, body temperature, skin pinch 2, water intake. Monitoring of the recovery from 2 dehydration after the use of electrolytes and antibiotics.
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 2,4% Ernstig 75,8% Matig 21,7% Licht	3
<b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions</b>	HEP: Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.	4 Citaat. No recovery from respiratory distress. In that case, the animal will be removed from the study and transferred to standard housing if possible or humanely euthanized. An animal will also be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	

## Pagina: 16

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 1-3-2023 13:09:32 +01'00'

Citaat.

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 3-3-2023 16:37:36 +01'00'

---

Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 3-3-2023 16:37:44 +01'00'

5.2 lid1

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 3-3-2023 16:37:48 +01'00'

5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 3-3-2023 16:38:00 +01'00'

dat is de uitkomstparameter van het onderzoek

---

Nummer: 3      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 1-3-2023 13:09:22 +01'00'

5.2 lid1

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 3-3-2023 16:38:13 +01'00'

---

Nummer: 4      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 1-3-2023 13:58:32 +01'00'

Zie 3.4.3.1.

Status

5.2 lid1 Geaccepteerd 3-3-2023 16:39:08 +01'00'

5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 3-3-2023 16:39:08 +01'00'

2

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid 1



## 5.2 lid 1

5.2 lid 1 De aanvrager is verzocht om de criteria te concretiseren.

Van de E. coli geïnfecteerde dieren in bijlage 3 zal naar verwachting 3% (5 dieren) overlijden en ernstig ongerief ondergaan. 5.2 lid 1

5.2 lid 1  
5.2 lid 1 De aanvrager is verzocht om de HEP SLA monitoringsfrequentie op dit punt verder toe te lichten en uit te leggen waarom ernstig ongerief niet kan worden voorkomen. Indien ernstig ongerief niet uitgesloten kan worden dient de voorwaarde van een beoordeling achteraf aan het project te worden verbonden.

5.2 lid 1  
5.2 lid 1 De aanvrager is verzocht om toe te lichten waarop de hypothese is gebaseerd dat: "the optimal dietary buffering capacity differs in suboptimal (i.e., low sanitary conditions or high pathogenic load) conditions".

De dieren krijgen geen strooisel zullen dus niet volgens de Richtlijn worden gehuisvest. Hiervoor wordt geen onderbouwing gegeven onder C, maar wel onder A. Dit wordt gedaan omdat inname van strooisel de resultaten kunnen beïnvloeden. Ook worden de dieren in bijlage 4 voor 2 tot 4 weken individueel gehuisvest, om voedselinname te kunnen bepalen en urine en feces te verzamelen. 5.2 lid 1

5.2 lid 1

4 De aanvrager geeft in het projectvoorstel aan dat zowel het E. coli challenge model als het management model (suboptimale condities) lijken op de omstandigheden op commerciële bedrijven. Beide modellen worden gebruikt om voorspellingen te doen of een voedingsstrategie in de praktijk effectief zal zijn. De meerwaarde van inzichten uit het challenge model, ten opzichte van het management model, worden echter niet toegelicht. Het management model kijkt echter naar effecten van subklinische infecties en geeft maximaal licht ongerief, terwijl het challenge model bij een aantal dieren tot de dood (ernstig ongerief) kan leiden. 5.2 lid 1

5.2 lid 1

## Pagina: 17

---

Nummer: 1      Auteur: 5.2 lid1      Onderwerp: Notitie Datum: 1-3-2023 14:16:43 +01'00'  
Dieren in bijlage 3 en 4 worden niet gedood. Ze worden gehouden of verkocht aan de commerciële opfok industrie

Status

5.2 lid1      Geaccepteerd      3-3-2023 16:39:33 +01'00'

---

Nummer: 2      Auteur: 5.2 lid1      Onderwerp: Doorhalen      Datum: 1-3-2023 14:14:42 +01'00'  
staat in de aanvraag

Status

5.2 lid1      Geaccepteerd      3-3-2023 16:40:05 +01'00'

---

Nummer: 3      Auteur: 5.2 lid1      Onderwerp: Markering      Datum: 1-3-2023 11:47:00 +01'00'  
Beide

Status

5.2 lid1      Geaccepteerd      3-3-2023 16:41:31 +01'00'

---

Nummer: 4      Auteur: 5.2 lid1      Onderwerp: Markering      Datum: 1-3-2023 14:19:45 +01'00'

5.2 lid1

Status

5.2 lid1      Geaccepteerd      3-3-2023 16:41:33 +01'00'

5.2 lid 1

5.2 lid 1  Het heeft de aanvrager daarom verzocht om het nut en de noodzaak van het challenge model toe te lichten.

Het project richt zich op voeding voor jonge biggen 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 onder andere op het verbeteren van voedingsstrategieën die mede kunnen leiden tot een toename van de gezondheid en het welzijn van biggen rond speenleeftijd.

Voor de dieren is er sprake van licht tot ernstig (n=5) ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten kennis over de ontwikkeling van maag/darmstelsel van jonge biggen en de invloed van voeder/nutriënten rondom de speenleeftijd, kennis, gezondheidsaspecten (en daarmee ook productie), welzijnsaspecten en mogelijk ook duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu.

5.2 lid 1

#### 6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid 1

#### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

## Pagina: 18

 Nummer: 1 5.2 lid1	Auteur: 5.2 lid1	Onderwerp: Markering	Datum: 1-3-2023 11:48:13 +01'00'
 Nummer: 2 Secretariaat	Auteur: 5.2 lid1	Onderwerp: Markering	Datum: 1-3-2023 11:48:56 +01'00'
 Nummer: 3 Spatie	Auteur: 5.2 lid1	Onderwerp: Notitie Datum: 1-3-2023 11:49:28 +01'00'	
 Nummer: 4 1-6-2023	Auteur: 5.2 lid1	Onderwerp: Markering	Datum: 1-3-2023 11:50:45 +01'00'
 Nummer: 5 31-5-2028	Auteur: 5.2 lid1	Onderwerp: Markering	Datum: 1-3-2023 11:50:53 +01'00'





# Advies aan CCD

Datum 03 maart 2023  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202316684

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health.  
Aanvraagnummer: AVD202316684  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

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

<b>Proces</b>	<p>Vragen project.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- De beslisstrategie omtrent go/no-go momenten is onvoldoende helder. In het projectvoorstel geeft u aan dat de go/no-go beslissingen gebaseerd zijn op een vooraf bepaald 'key performance indicators set', maar noemt enkel 3 voorbeelden van performance indicatoren. Kunt u de gehele set benoemen? Kunt u ook aangeven hoe deze indicatoren gewogen zullen worden in de beslissing?</li><li>- Kunt u toelichten waarom 'Growth performance' onder 3.4.1 als typical key performance indicator wordt benoemd voor het maken van go/no-go beslissingen en op welke manier deze indicator aansluit bij de onder 3.2.1 benoemde projectdoelen?</li><li>- Wij verzoeken u om in de bijlagen, onder C, te onderbouwen waarom bij de huisvesting van de dieren zal worden afgeweken van Richtlijn 2010/63/EU.</li><li>- Kunt u in bijlage 3.4.3.1 ook onder C. (huisvesting en verzorging) benoemen dat een deel van de dieren voedselrestrictie zal ondergaan?</li><li>- In het projectvoorstel staat dat zowel het E. coli challenge model als het management model (suboptimale condities) de omstandigheden op commerciële bedrijven nabootsen om voorspellingen te kunnen doen over de effectiviteit van voedingsstrategieën in de praktijk. Uit uw projectaanvraag blijkt echter niet waarom het noodzakelijk is om beide modellen hiervoor te gebruiken. Kunt u toelichten welke inzichten het challenge model toevoegt aan de inzichten die door middel van het</li></ul>
---------------	--

	<p>management model verworven zullen worden en waarom deze relevant zijn voor het (beter) kunnen voorspellen van de effectiviteit van een nieuwe voedingsstrategie in de praktijk?</p> <p>- Kunt u toelichten waarom het niet mogelijk is om humane eindpunten te formuleren die in combinatie met scherpe monitoring kunnen voorkomen dat dieren komen te overlijden aan een E. coli infectie?</p> <p>Vragen NTS.</p> <p>- Kunt u voor jargonwoorden, zoals spenen, tomen en management model toelichten wat deze betekenen?</p> <p>- Kunt u toelichten wat optimale en suboptimale varkenshouderij en waarom het van belang is om voor beide varianten voeders te ontwikkelen?</p> <p>- 3% van de dieren die een e-coli challenge krijgen worden zo ziek dat ze komen te overlijden. Deze oorzaak van het ernstige ongerief wordt niet benoemd in 'adverse effects' sectie. Kunt u deze sectie aanpassen zodat het voor de lezer duidelijk is dat dit challenge model ernstige gezondheidsproblemen kan veroorzaken?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Nutrient utilization model</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen tot 6 weken na spenen	888	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.2 Management model</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen tot 6 weken na spenen	1.254	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.3 E. coli challenge model</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen tot 6 weken na spenen	207	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )		160	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Nutrient utilization model

Citaat.

During the pre-weaning phase of the experiment piglets will be housed in conventional farrowing crates together with the dam.

Piglets will be housed without bedding material. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor.

### 3.4.3.2 Management model

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.3 E. coli challenge model

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions

Citaat.

Piglets will be individually housed for 2 (experiment 2) to 4 weeks (experiment 1). Piglets will have visual, tactile and olfactory contact with neighbouring pens via a hole in the wall. Piglets will be housed without bedding material. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Nutrient utilization model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### 3.4.3.2 Management model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### 3.4.3.3 E. coli challenge model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### 3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions

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 C8. [...] Omdat gekozen is de dieren voortaan op eigen locatie te huisvesten in plaats van gebruik te maken van bestaande varkenshouderijen, heeft men een validatiestudie opgenomen die goed is toegelicht.</p> <p>Citaat C10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Tijdens de fase voorafgaand aan het spenen zijn de biggen samen met de zeug ondergebracht in conventionele kraamhokken. De biggen worden gehuisvest zonder strooiselmateriaal. Er zal wel niet-eetbare kooiverrijking zijn om de dieren in staat te stellen te spelen en normaal gedrag te vertonen. De kooiverrijking voldoet aan de eisen die de NVWA stelt. De kooien hebben een zachte tenderfoot bodem.</p> <p>Citaat C20. Hergebruik voor andere experimenten is niet overwogen omdat de biggen na afloop naar varkenshouderijen gaan: herplaatsing.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat.</p> <p>1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk om voedingsstrategieën te ontwikkelen die beter aan de eisen voldoen van biggen voor, rond en na het spenen in optimaal en suboptimale (inclusief pathogene druk) omstandigheden met als uiteindelijke doel een bijdrage te leveren aan de verduurzaming van de varkenshouderij door antibioticagebruik en sterfte van jonge biggen te verminderen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.</p> <p>2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de 2187 proefdieren plaats, met mild ongerief, voor 322 dieren kan maximaal matig ongerief optreden.</p> <p>Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen, dat meer kennis wordt verkregen over de ontwikkeling van maag/darmstelsel van jonge biggen en de invloed van voeder/nutriënten rondom de speenleeftijd. Ook zal met verbeterde voedingsstrategieën een duurzamer houderijsysteem kunnen worden ontwikkeld. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de instelling van belang kan zijn om daarmee</p>
-------------------	--

commerciële voeders te ontwikkelen is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar geen gewicht aan toe. Omdat de aanvrager heeft besloten eigen stallen te ontwikkelen om het onderzoek 'in huis' te kunnen uitvoeren, is een eenmalige validatie studie noodzakelijk. De DEC heeft dit meegenomen in haar afweging.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het doel om voedingsstrategieën te ontwikkelen die beter aan de eisen voldoen van biggen voor, rond en na het spenen in optimaal en suboptimale (inclusief pathogene druk) omstandigheden met als uiteindelijke doel een bijdrage te leveren aan de verduurzaming van de varkenshouderij door antibioticagebruik en sterfte van jonge biggen te verminderen een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt, dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	
<p>Het DEC advies is niet geheel helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld en bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere uiteenzetting. Bij C10 hadden wij echter graag ook een oordeel teruggezien over de onderbouwing voor afwijkende huisvesting van de dieren.</p> <p>De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen, maar gaat voorbij aan het ernstige ongerief dat de dieren in bijlage 3 zullen ondergaan. Ook hadden wij graag gezien dat het ernstige ongerief inhoudelijk was beoordeeld onder C11. In verband met dit ernstige ongerief is de beoordeling achteraf onder E1. een vereiste voorwaarde.</p> <p>Het project richt zich op voeding voor biggen in de veehouderij. Daarmee speelt het ethische dilemma rondom de veehouderij ook bij dit project. Dit hadden wij graag in het advies teruggezien.</p>	

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat.</p> <p>The ultimate goal of this project is to develop nutritional strategies that will better meet the requirements of piglets before, around, and after weaning in optimal and sub-optimal (including pathogenic pressure) environments. With these nutritional strategies, we aim to increase the sustainability of pig production by helping to reduce mortality rate and the use of antibiotics, by using raw materials that meet animal requirements, by supporting feed intake and gastrointestinal tract development around weaning, and by improving animal welfare for example by reducing abnormal behaviour (tail, biting, belly nosing).</p> <p>The immediate goals are:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. To validate a management model that simulates commercial conditions but in a controlled environment (Appendix 2).</li><li>2. To determine the optimal lysine to energy ratio and energy level in piglets after weaning (Appendix 1).</li><li>3. To determine the effect of creep feed, fatty acid level and fatty acid composition on fat digestibility, bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development, and blood lipid metabolite profile after weaning (Appendix 1). Socializing the piglets before weaning might be used as model to reduce weaning stress and, thus, to disentangle the effect of stress from feed transition (sow milk to solid feed) from social stress (mixing of piglets) on fat digestibility. The optimal fatty acid level and fatty acid composition will also be determined under suboptimal</li></ol>
-------------------------------------	---

sanitary conditions (Appendix 2) in order to translate the knowledge into practical conditions.

4. To determine the optimal ratio between unsaturated and saturated (U:S ratio) fatty acids on fat digestibility under optimal (Appendix 1) and suboptimal sanitary conditions (Appendix 2).

5. To determine the interaction between dietary protein level and specific amino acids requirements under optimal and suboptimal sanitary conditions. Nitrogen balance experiments will be done to determine protein deposition under optimal and suboptimal sanitary conditions (Appendix 4). The optimal protein and amino acid levels will be verified in a growth performance trial under optimal (no animal experiment) and suboptimal sanitary conditions (Appendix 2).

6. To determine the interaction between feed particle size and the optimal inclusion level of coarse raw materials in the diet given before and after weaning on stomach and intestinal development and nutrient digestibility after weaning under optimal (Appendix 1), suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) and a specific pathogen challenge (E. coli challenge model; Appendix 3).

7. To determine the effect of feed form (mash, pellet, crumble, extruded feed) and transition between feed forms at weaning on gastrointestinal development and health (Appendix 1).

8. To determine the optimal buffering capacity in diets for piglets after weaning under suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) conditions. Optimal levels under optimal conditions were already established in an in-house study.

9. To determine the interactive effect between buffering capacity and feed particle size distribution on gastrointestinal development and health (Appendix 1).

Next to the response parameters specified in the appendices, we will also evaluate sustainability metrics when applicable. The metrics are divided in diet-related and animal-related metrics. Diet-related: resource (use of fossil fuel) and water use, environmental acidification, nitrogen and phosphorus excretion during pig production, CO<sub>2</sub> emission from transport of raw materials or from raw material production itself. Animal-related: behaviour scores, body condition scores, mortality, and morbidity.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>The scientific relevance of the immediate goals is to better understand the piglet's requirements around weaning which is one of the most stressful events in a pig's life. The lack of understanding of the physical state and the variable response to weaning of the post-weaning piglet makes it challenging for nutritionists to establish an optimal diet. However, there are certain aspects that are similar between piglets: they all need energy to survive, nutrients to develop their gastrointestinal tract, and need adequate nutrition to combat pathogens and stay healthy. Moreover, changes in legislation, e.g., the expected ban on tail docking and use of in-feed antibiotics and pharmacological levels of zinc oxide, stress the need to understand the nutritional requirements of piglets in this phase, also to prevent damaging behaviours. Nutrient requirements for weaned piglets are mostly extrapolated from older pigs and we have just started to unravel the complex physiology of a piglet around weaning and its accompanying nutrient requirements. Results from the immediate project goals will be used to further optimize piglet feeding strategies internally but our results will also be published in scientific journals. Regarding the social relevance of the ultimate goal, main aspects are to further reduce reliance on antibiotics for pigs in order to maintain future availability of antibiotics for human medicine. Secondly, this project will contribute to the use of non-human-edible feed ingredients (e.g., co-products from food production) for feed, leaving human-edible ingredients available as food.</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.</p> <p>De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De instelling is een internationaal diervoedingsbedrijf dat voedingsadditieven en voedingsstrategieën ontwikkelt voor de meeste diersoorten. Het bedrijf heeft de ambitie om een wereldleider te zijn op dit gebied en focussed duurzame veehouderij, zoals het verminderen van antibioticagebruik, het verbeteren van de gezondheid en het welzijn van dieren en het verminderen van de milieubelasting van de veehouderij door bijvoorbeeld het verminderen van nutriëntenverliezen in urine en uitwerpselen en het verminderen van emissies in verband met de productie. Het bedrijf wil kennis vergaren over de afgifte van voedingsstoffen in de darm en een betere vertering en gebruik van grondstoffen met een lagere beschikbaarheid/ verteerbaarheid van voedingsstoffen. Het bedrijf heeft een speciale R&amp;D-afdeling met onderzoeksteams voor alle soorten in omvang, inclusief varkens. Elk soortenteam heeft ongeveer 6 onderzoekswetenschappers die een doctoraat hebben met betrekking tot dier- of diergeneeskunde en ze onderhouden een breed internationaal wetenschappelijk netwerk. De studies zullen worden uitgevoerd in het eigen onderzoekscentrum in Nederland, waar is geïnvesteerd in een state-of-the-art unit en waar proeven kunnen worden uitgevoerd die specifieke omgevingscondities nabootsen en beheersen. Hoge bioveiligheids- en hygiënenormen worden gehandhaafd om personeel en dieren te beschermen. Dagelijkse verzorging van dieren, metingen en experimentele technieken worden uitgevoerd door gecertificeerd competent en ervaren personeel. Projectresultaten zullen worden verspreid via wetenschappelijke tijdschriften en conferenties en uiteindelijk worden vertaald in voedingsstrategieën, die worden toegepast via het wereldwijde netwerk van voedingsdeskundigen.</p> <p>5.2 lid1</p>
---	---

<p><b>3V's</b> Vervanging</p>
-----------------------------------

	<p><b>3.4.3.1 Nutrient utilization model:</b> Citaat.</p> <p>We have an in-house in vitro digestion kinetics model in which we can screen raw materials and diets. Wherever possible, first a screening with this model will be done in order to select the raw materials and diets to be tested in in vivo studies. Interactions between raw materials and /or nutrients on e.g., digestibility and nutrient utilization, passage through the gastrointestinal tract, and acidification in the stomach cannot be studied outside animals. Especially not in a weaned piglet where digestive physiology changes rapidly due to weaning. Animal data is also needed to validate the in vitro digestion kinetics model.</p> <p>Faecal samples could be obtained non-invasively but are not representative for what is happening in different parts of the gastrointestinal tract. For this project, the stomach and small intestine are the most important parts of the gastrointestinal tract.</p> <p>Changes in digestive physiology and the stress around weaning occurs in all husbandry systems.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Management model:</b> Citaat.</p> <p>A response in growth of an animal to a nutritional strategy cannot be determined without using animals. The physiology of a piglet, especially after weaning, and its response to suboptimal environmental conditions cannot be modelled in in vitro or in silico systems. Suboptimal conditions are common in commercial husbandry, but the parameters are not controlled. In order to study the response to nutritional strategies in a reliable and repeatable way, we need controlled conditions such as those obtained with the management model.</p>
	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.</p> <p>A response in diarrhoea incidence of an animal to a nutritional strategy cannot be determined without using animals. The physiology of a piglet, especially after weaning, cannot be modelled in in vitro or in silico systems. Organoids could be considered but organoids resemble the physiology of the state of the animal that it was made from. For example, organoids from slaughter material will resemble the physiology of the slaughtered animal and not from a weaned piglet. In order to obtain organoids from weaned piglets, piglets in this life phase need to be sacrificed. An organoid, however, is not suitable to look at the whole gastrointestinal tract, including stomach, small and large intestine, and the residing microbiota. The interaction within the gastrointestinal tract can only be studied in an animal of the appropriate age.</p> <p>Post-weaning diarrhoea and the stress around weaning occurs in all husbandry systems. Pathogens are present in all systems and stress will give room for health issues caused by these pathogens</p>

**3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:**

Citaat.

Responses of animals towards different protein and amino acid levels under optimal and specific pathogen conditions needs to be determined in the animal itself. The used dietary protein and amino acids levels will be based on literature. In silico models will be used to assure that the desired effect will be seen. The in silico model, however, is not capable of estimating the effect of a specific pathogen on requirements. The results of the in vivo experiment will be used to improve the in silico model.

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Nutrient utilization model:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies and literature data (see 3.1 Background in the project proposal) to decide on the treatments to be studied. Go/no go decisions per nutritional strategy ensures that only the most promising strategies will be tested in follow-up studies, allowing for the reduction in the number of animals potentially required.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Management model:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies and literature (see 3.1 Background in the project proposal) to decide on the treatments to be studied. The model will be validated first and a go/no go decision will follow before continuing with the other experiments (12-16). Go/no go decisions per nutritional strategy ensures that only the most promising strategies will be tested in challenge studies, allowing for the reduction in the number of animals potentially required.</p>
	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies (outside this project proposal), literature (see 3.1 Background in the project proposal), and Exp 5, 6, and 14 to decide on the treatments to be studied. Only the most promising nutritional strategies, i.e., decided based on go/no go decisions, will be tested in this Appendix. This results in a reduction in the number of animals required for this Appendix.  RS and SS animals will be used to ensure that we obtain a difference in diarrhoea incidence (=main outcome parameter). This will lower the variation and, thus, increase the power and reduce the number of animals needed to show an effect.</p>
	<p><b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:</b>  Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. RS and SS animals will be used to ensure that we obtain a difference in diarrhoea incidence (=main outcome parameter). This will lower the variation and, thus, increase the power and reduce the number of animals needed to show an effect.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Nutrient utilization model:</b> Citaat.  Piglets after weaning are the target animals and their physiology cannot be obtained in other species or in models.  Animals will be sedated before euthanasia.  In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).  Additional health checks will be done for experiment 2 when for the treatment where feed intake is restricted.  Standard operating procedures will be used for faeces collection to reduce variation between studies.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Management model:</b> Citaat.  Piglets after weaning are the target animals and their physiology cannot be obtained in other species or in models.  Animals will be group housed.  Animals will be sedated before euthanasia.  In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).  Animals will be checked daily by trained staff. Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing.  The goal of the management model is to get a subclinical immune response and it is, therefore, not a disease challenge model. In case of signs of disease, animals will be treated and if needed removed from the study (Humane Endpoint).</p>

	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.</p> <p>Piglets will be housed in groups of 3. In case 1 piglet needs to be removed (Humane End Point) or dies, piglets are still with 2 in a pen. If a second piglets needs to be removed or dies, the remaining piglet will be removed from the study and housed with other piglets in a separate barn.</p> <p>In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).</p> <p>Animals will be checked twice daily by trained staff after the E. coli challenge at least until the trained staff member indicates that there are no further health issues observed. The animals will then be checked once daily again.</p> <p>Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing. Piglets will be weighed before the E. coli inoculum is given. When a piglet has lost too much body weight or is in poor health before the E. coli challenge, the piglet is removed from the study and transferred to a standard housing pen at the same facility.</p>
	<p><b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:</b> Citaat.</p> <p>Piglets are the target animals. Using other animals (mice, rats) as a model will not result in less discomfort to an individual. In addition, protein deposition is species specific. Therefore, the experimental treatments should be tested in the target animal directly. Pigs will receive non-edible enrichment material to reduce stress and expression of abnormal behaviour. Pigs are closely followed to check health and welfare issues during the experiments, with both being documented daily and medical treatments will be applied if necessary. Nitrogen efficiency will be measured indirectly using total collection of faeces and urine to reduce discomfort. Pigs are social animals and will be housed in groups for the first two weeks. Period and number of pigs that need to be housed individually are limited as much as possible. When housed individually nose to nose contact is still possible. Pigs are housed in pens specially designed for individual housing with floor heating ensuring the temperature is within the thermoneutral zone. Blood sampling will be performed by trained personnel.</p> <p>We will do whatever is possible to adapt piglets to human handling prior to the start of the experiment in order to refine the procedure of attaching the stoma bags.</p>

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Nutrient utilization model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Management model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 E. coli challenge model	Nee	
3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions	Nee	

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Nutrient utilization model</b>	HEP: Worden niet verwacht	
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Management model</b>	HEP: Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.	Citaat. No recovery from respiratory distress. In that case, the animal will be removed from the study and transferred to standard housing if possible or humanely euthanized. An animal will also be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	
<b>3.4.3.3 E. coli challenge model</b>	HEP: 3%	Citaat. Body weight loss before the E. coli challenge. Dehydration after the E. coli challenge by visual examination, body temperature, skin pinch test, water intake. Monitoring of the recovery from dehydration after the use of electrolytes and antibiotics.
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 2,4% Ernstig 75,8% Matig 21,7% Licht	
<b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions</b>	HEP: Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.	Zie 3.4.3.2.
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Matig	



## 5 Samenvatting

5.2 lid1

5.2 lid1

De aanvrager is verzocht om de criteria te concretiseren.

Van de E. coli geïnfecteerde dieren in bijlage 3 zal naar verwachting 3% (5 dieren) overlijden en ernstig ongerief ondergaan. 5.2 lid1

De aanvrager is verzocht om de HEP's op dit punt verder toe te lichten en uit te leggen waarom ernstig ongerief niet kan worden voorkomen. Indien ernstig ongerief niet uitgesloten kan worden dient de voorwaarde van een beoordeling achteraf aan het project te worden verbonden.

De dieren krijgen geen strooisel zullen dus niet volgens de Richtlijn worden gehuisvest. Hiervoor wordt geen onderbouwing gegeven onder C, maar wel onder A. Dit wordt gedaan omdat inname van strooisel de resultaten kunnen beïnvloeden. Ook worden de dieren in bijlage 4 voor 2 tot 4 weken individueel gehuisvest, om voedselinname te kunnen bepalen en urine en feces te verzamelen. 5.2 lid1

De aanvrager geeft in het projectvoorstel aan dat zowel het E. coli challenge model als het managementmodel (suboptimale condities) lijken op de omstandigheden op commerciële bedrijven. Beide modellen worden gebruikt om voorspellingen te doen of een voedingsstrategie in de praktijk effectief zal zijn. De meerwaarde van inzichten uit het challenge model, ten opzichte van het management model, worden echter niet toegelicht. Het management model kijkt echter naar effecten van subklinische infecties en geeft maximaal licht ongerief, terwijl het challenge model bij een aantal dieren tot de dood (ernstig ongerief) kan leiden. 5.2 lid1

Het project richt zich op voeding voor jonge biggen 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 onder andere op het verbeteren van voedingsstrategieën die mede kunnen leiden tot een toename van de gezondheid en het welzijn van biggen rond speenleeftijd.

Voor de dieren is er sprake van licht tot ernstig (n=5) ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten kennis over de ontwikkeling van maag/darmstelsel van jonge biggen en de invloed van voeder/nutriënten rondom de speenleeftijd, kennis, gezondheidsaspecten (en daarmee ook productie), welzijnsaspecten en mogelijk ook duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu. **5.2 lid1**

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

**5.2 lid1**

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 3 maart 2023 15:46  
**Aan:** 5.1 lid2h 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 202316684

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Op 06-01-2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health." met aanvraagnummer AVD 202316684. 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

- Kunt u voor jargonwoorden, zoals spenen, tomen en management model toelichten wat deze betekenen? - Kunt u toelichten wat optimale en suboptimale varkenshouderij en waarom het van belang is om voor beide varianten voeders te ontwikkelen? - 3% van de dieren die een e-coli challenge krijgen worden zo ziek dat ze komen te overlijden. Deze oorzaak van het ernstige ongerief wordt niet benoemd in 'adverse effects' sectie. Kunt u deze sectie aanpassen zodat het voor de lezer duidelijk is dat dit challenge model ernstige gezondheidsproblemen kan veroorzaken?

#### Onduidelijkheden

- De beslisstrategie omtrent go/no-go momenten is onvoldoende helder. In het projectvoorstel geeft u aan dat de go/no-go beslissingen gebaseerd zijn op een vooraf bepaald 'key performance indicators set', maar noemt enkel 3 voorbeelden van performance indicatoren. Kunt u de gehele set benoemen? Kunt u ook aangeven hoe deze indicatoren gewogen zullen worden in de beslissing?

- Kunt u toelichten waarom 'Growth performance' onder 3.4.1 als typical key performance indicator wordt benoemd voor het maken van go/no-go beslissingen en op welke manier deze indicator aansluit bij de onder 3.2.1 benoemde projectdoelen?

- Wij verzoeken u om in de bijlagen, onder C, te onderbouwen waarom bij de huisvesting van de dieren zal worden afgeweken van Richtlijn 2010/63/EU.

- Kunt u in bijlage 3.4.3.1 ook onder C. (huisvesting en verzorging) benoemen dat een deel van de dieren voedselrestrictie zal ondergaan?

- In het projectvoorstel staat dat zowel het E. coli challenge model als het management model (suboptimale condities) de omstandigheden op commerciële bedrijven nabootsen om voorspellingen te kunnen doen over de effectiviteit van voedingsstrategieën in de praktijk. Uit uw projectaanvraag blijkt echter niet waarom het noodzakelijk is om beide modellen hiervoor te gebruiken. Kunt u toelichten welke inzichten het challenge model toevoegt aan de inzichten die door middel van het management model verworven zullen worden en waarom deze relevant zijn voor het (beter) kunnen voorspellen van de effectiviteit van een nieuwe voedingsstrategie in de praktijk?

- Kunt u toelichten waarom het niet mogelijk is om humane eindpunten te formuleren die in combinatie met scherpe monitoring kunnen voorkomen dat dieren komen te overlijden aan een E. coli infectie?

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 echter uiterlijk 8 maart 2023 op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 10 maart 2023 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: 0800 789 0789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Antwoorden n.a.v. vragen van de CCD over aanvraag AVD5.1 (a21) 202316684

Onderdeel	Vraag	Antwoord/actie
Niet technische samenvatting	Kunt u voor jargonwoorden, zoals spenen, tomen en management model toelichten wat deze betekenen?	De tekst is aangepast in het groen. Het woord 'spenen' komt ook in de titel voor. Er is gekozen om het hier te laten staan om de titel niet te vaag te laten worden.
	Kunt u toelichten wat optimale en suboptimale varkenshouderij en waarom het van belang is om voor beide varianten voeders te ontwikkelen?	De tekst is verduidelijkt (in het groen).
	3% van de dieren die een e-coli challenge krijgen worden zo ziek dat ze komen te overlijden. Deze oorzaak van het ernstige ongerief wordt niet benoemd in 'adverse effects' sectie. Kunt u deze sectie aanpassen zodat het voor de lezer duidelijk is dat dit challenge model ernstige gezondheidsproblemen kan veroorzaken?	De tekst is aangepast in het groen.
Projectvoorstel 3.1 Background + Appendix 3	In het projectvoorstel staat dat zowel het E. coli challenge model als het management model (suboptimale condities) de omstandigheden op commerciële bedrijven nabootsen om voorspellingen te kunnen doen over de effectiviteit van voedingsstrategieën in de praktijk. Uit uw projectaanvraag blijkt echter niet waarom het noodzakelijk is om beide modellen hiervoor te gebruiken. Kunt u toelichten welke inzichten het challenge model toevoegt aan de inzichten die door middel van het management model verworven zullen worden en waarom deze relevant zijn voor het (beter) kunnen voorspellen van de effectiviteit van een nieuwe voedingsstrategie in de praktijk?	De meeste praktijkbedrijven ervaren een vorm van ziektedruk veroorzaakt door verschillende omstandigheden, bijvoorbeeld suboptimaal klimaat en hygiëne waardoor verschillende bacteriën op verschillende plekken in het lichaam (luchtweg en darm) voor een subklinische immuun response kunnen zorgen. Dit wordt bestudeerd in het management model wat daarmee een algemener model is dan het E. coli model. E. coli is namelijk één van de hoofdveroorzakers van speendiarree en dus specifiek voor de darm. Het E. coli model biedt specifieke inzichten in de effecten van een voerstrategie op deze hoofdveroorzaker van speendiarree. De tekst in de background en appendix 3 is aangepast (in het groen) ter verduidelijking.
Projectvoorstel 3.4 Strategy	De beslisstrategie omtrent go/no-go momenten is onvoldoende helder. In het projectvoorstel geeft u aan dat de go/no-go beslissingen gebaseerd zijn op een vooraf bepaald 'key performance indicators set', maar noemt enkel 3 voorbeelden van	De genoemde 3 indicatoren gelden voor elk van de voorgestelde experimenten en omvatten de complete set van key performance indicatoren. Ze zijn gebaseerd op de parameters die van belang zijn om een voerstrategie in de markt te laten slagen. Per experiment zal een verwacht

	<p>performance indicatoren. Kunt u de gehele set benoemen? Kunt u ook aangeven hoe deze indicatoren gewogen zullen worden in de beslissing?</p>	<p>doel in percentage verhoging of vermindering t.o.v. de controle gesteld worden waaraan de werking van de nutritionele strategie getoetst wordt. Dit percentage verschilt per nutritionele strategie (energie en vezels werken op een andere manier en hebben daarom een ander potentieel) en daarom kan hier geen algemeen getal gegeven worden. De indicatoren wegen zwaar mee in de beslissing om door te gaan met een bepaalde nutritionele strategie. De tekst is aangepast (in het groen).</p>
	<p>Kunt u toelichten waarom 'Growth performance' onder 3.4.1 als typical key performance indicator wordt benoemd voor het maken van go/no-go beslissingen en op welke manier deze indicator aansluit bij de onder 3.2.1 benoemde projectdoelen?</p>	<p>Als een varken zich niet goed voelt of ziek is, zal deze minder gaan eten en niet gaan groeien. Een varkenshouder merkt dit op aan de hand van de verminderde voeropname en visueel achteruitgaan van de lichaamsconditie wat zich vertaalt in groei. Een vermindering van voeropname is tevens nadelig voor de darmontwikkeling en weerstand van het varken tegen ziekteverwekkers. Groei is daarom een makkelijk te bepalen en indirecte uitleesparameter voor voeropname, gezondheid en welzijn. De projectdoelen onder 3.2.1 gaan dieper in op de fysiologie van het varken. Wanneer er veranderingen in de fysiologie optreden, zal zich dit uiteindelijk ook vertalen in een verandering in groei.</p>
Appendix 1-4	<p>Wij verzoeken u om in de bijlagen, onder C, te onderbouwen waarom bij de huisvesting van de dieren zal worden afgeweken van Richtlijn 2010/63/EU.</p>	<p>In alle bijlagen is uitleg toegevoegd over het afwezig zijn van bedding materiaal (vanwege verwachte verhoogde variatie in uitkomstparameters), gebruik van tenderfoot vloeren, en individuele huisvesting (alleen appendix 4). De tekst is aangepast in het groen.</p>
Appendix 1 en 4	<p>Kunt u in bijlage 3.4.3.1 ook onder C. (huisvesting en verzorging) benoemen dat een deel van de dieren voedselrestrictie zal ondergaan?</p>	<p>De voerrestrictie in appendix 1 is om de praktijksituatie na te bootsen. De voerrestrictie in appendix 4 is om het effect van voerstrategie los te kunnen koppelen van het effect van voeropname. In bijlagen 1 en 4 wordt een deel van de dieren ook onder de huidig bekende aminozuurbehoefte gevoerd. Dit is nodig om een optimum in behoefte te kunnen</p>

		bepalen. De tekst is aangepast in het groen.
Appendix 3	Kunt u toelichten waarom het niet mogelijk is om humane eindpunten te formuleren die in combinatie met scherpe monitoring kunnen voorkomen dat dieren komen te overlijden aan een E. coli infectie?	<p>De meest betrouwbare uitleesparameter voor het herstel na de E. coli infectie is het monitoren van uitdroging. De E. coli infectie veroorzaakt namelijk diarree en ernstige diarree kan leiden tot uitdroging. Wanneer dit plaatsvindt, is het humane eindpunt bereikt.</p> <p>In de periode na de E. coli challenge wordt hierom frequenter gelet op uitdrogingsverschijnselen. Echter een dier kan ook doodgaan zonder eerst tekenen van uitdroging te vertonen en het is dan het meest waarschijnlijk dat dit dier is gestorven aan een andere oorzaak dan E. coli. Echter als we dit dier opsturen naar de GD om de doodsoorzaak vast te stellen, komt hier hoogstwaarschijnlijk E. coli uit aangezien het dier geïnfecteerd is geweest. Dit dier moeten we daarom registreren als ernstig ongerief vanwege de experimentele handeling. Dus het maximum van 3% van de dieren kan niet voorkomen worden, aangezien dit ook de sterfte omvat die normaal in deze periode voorkomt. De tekst is aangepast in het groen.</p>



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0800-7890789).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1.1a2f
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1.1a2h
- 1.3 Provide the title of the project. Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health.

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.



The weaning process, in general, is the most stressful period in the life of a pig. It is accompanied by removal from the sow, mixing of piglets, changing environment with accompanying microbiological changes, and change in feed from highly digestible sow milk to a solid feed diet containing typically less digestible raw materials. Altogether, this results in a drop in feed intake which often results in gut wall damage such as atrophy of the villi and increases in permeability (Pluske, et al., 1997). This renders the piglets vulnerable to digestive pathogens like pathogenic *E. coli*, responsible for post-weaning diarrhoea (PWD). Although abrupt and early weaning are known to exacerbate the above-mentioned processes (Buchet et al., 2017), piglets in all husbandry systems will experience some level of stress around weaning, especially considering the sub-optimal hygiene conditions often occurring on farms. This stress is the main factor for health problems in the nursery and this, in turn, is responsible for a large part of the antibiotic usage in swine production. In this proposal we aim to develop nutritional solutions that will support the piglet before, during and after the weaning process by providing nutrients that better match its requirements than the currently available diets.

The current requirements for weaned piglets are largely based on those determined in older pigs (>35 kg body weight) while requirements for suckling piglets are lacking or largely based on nutrient levels in sow milk. The proposed nutritional solutions spinning off from this project should increase piglet health and welfare making them more robust to face the challenges around weaning. Moreover, they should increase sustainability of pig production by reducing mortality and the use of antibiotics, by using sustainable raw material sources, or by including strategies to optimize the use of raw materials sources (i.e., using enzymes or feed additives). It is highly important to start with nutritional interventions before weaning, for example, by providing piglets with supplemental milk or (solid) creep feed in order to adapt them in early life to raw materials present in diets after weaning (Huting et al., 2021). The intake of creep feed before weaning has been found to stimulate feed intake early after weaning (Bruininx et al., 2002), alter microbial populations towards a profile typically seen after weaning, increase microbial fermentation products (short chain fatty acids) exerting beneficial effects in the gastrointestinal tract, modulate intestinal development (length and weight of the gastrointestinal tract, increased absorptive area as indicated by an increased villus height to crypt depth ratio) at the time of weaning with subsequently less PWD (Choudhury et al., 2021a; Choudhury et al., 2021b). These studies indicate that there is a window of opportunity to prepare the piglet for the weaning process by nutritional solutions provided prior to weaning. Moreover, in the wild, piglets start to eat non-milk items from the first week of life onwards (Van Hees et al., 2022) indicating that their natural instinct is to search for food items other than sow milk already in early life. Thus, starting with nutritional solutions before weaning fits with the piglet's natural behaviour. In this proposal, we aim to focus on the following dietary components present in diets before and after weaning: energy, protein, fibres, minerals, and vitamins. Our studies are performed under standard practical conditions but in a research facility.

### **Energy**

Energy is typically provided to piglets in the form of starch and fat sources. Piglets before weaning mainly get their energy from milk fat, while after weaning the main energy source is starch from cereals. The fat content in sow's milk is around ~34% on dry matter basis, as compared to ~7% in a typical nursery diet (Jensen et al., 1997). Thus, during the weaning process, the piglet needs to change from fat digestion to starch digestion while at the same time the production of all pancreatic enzymes (i.e., lipase, amylase, trypsin and chymotrypsin) is hampered (Jensen et al., 1997). Thus, the digestive capacity of starch and fat is limited in the week(s) immediately after weaning. We have performed a study with different energy levels (2200 – 2700 kCal/kg) of the feed either coming from starch or from fat. The diets were fed for 2.5 weeks from day 14 after weaning (~9 kg body weight) onwards. We found that piglets were able to maintain similar energy intake by adapting their feed intake. A higher energy level from starch was beneficial in terms of fat and protein digestibility. Our findings were in contrast to Kim et al. (2021) who found that pigs with a body weight below 20 kg were not able to adjust feed intake to diets differing in energy level. Thus, there is a lack of understanding on the relation between feed intake and energy intake of young piglets (~24 to 38 days of age; ~5 kg body weight), but also on how piglets respond to different sources of energy (i.e., fat, starch or potentially protein or lactose). Piglet diets are typically formulated to provide an optimum ratio between amino acids and energy. This optimum has been determined in older pigs (~40 kg body weight) and extrapolated to piglets around

weaning (~4-10 kg body weight). However, with potential changes in energy level, we also need to re-evaluate the ratio between amino acids and energy, particularly in young piglets (~7kg).

#### **Protein level and amino acid ratio's**

Studies to determine the optimal protein level and ratio between essential and non-essential amino acids with the main aim to reduce nitrogen excretion in faeces and urine are typically done using older pigs and results are extrapolated to piglets around weaning. However, the gastrointestinal physiology of the weaned piglet is known to be different and, therefore, estimations of optimal protein level and amino acid ratios might be incorrect. Moreover, the optimal amino acid ratios might depend on the level of stress and presence of pathogens. Piglets with a high weaning stress (no feed before weaning and restricted feeding for 24 h after weaning) had a higher protein breakdown and higher utilization of amino acids by the gastrointestinal tract as compared to piglets with low weaning stress (Resink et al., 2022). Consequently, arginine and glutamine were found to be most limiting in this phase early after weaning as opposed to lysine in older pigs. An increased threonine supplementation was found to improve gut health when piglets were challenged with *E. coli* on day 7 after weaning (Trevisi et al., 2015). The interaction between fibres and kinetics of digestion of proteins (i.e., level of fermentable protein) can also influence requirements of amino acids such as threonine because of its role in mucus formation and antioxidant capacity (Wellington et al., 2020).

One of the strategies to combat PWD is through reducing dietary crude protein level (Heo et al., 2009) while supplementing the diet with synthetic essential amino acids. In a non-health challenge situation, we have studied the effect of supplementing several amino acids (histidine, valine, threonine, isoleucine, leucine, tryptophan, and methionine) to a low protein diet on growth of piglets after weaning. We found that growth was lower on the low protein diet compared to a high protein control diet and that none of the studied amino acids was able to sustain growth. This suggested that none of these amino acids were limiting in the diet contradicting our hypothesis. In low protein diets supplemented with synthetic amino acids, the essential:non-essential amino acid (EAA:NEAA) ratio is skewed towards the EAA potentially resulting in a lack of NEAA. Consequently, we hypothesize that the ratio between EAA:NEAA is more important in this phase of a piglet's life, especially in low protein diets. The NEAA can be synthesized by the body from EAA, but this process is not as efficient as supplying the right amount of NEAA through the diet. Thus, there is a general lack of understanding on protein and amino acids requirements in the youngest pigs and how they are modulated by weaning stress. A better understanding is expected to improve the use of protein sources and reduce PWD and nitrogen losses in faeces and urine.

#### **Gastrointestinal development: dietary acidification and fibres**

Before weaning, piglets rely on lactic acid bacteria to control stomach pH as hydrochloric acid production (HCl) in the stomach is still low (Cranwell et al., 1976). A piglet's maximum capacity to produce HCl is around 10 weeks of age. Thus, at the time of weaning, the piglet has limited capability to reduce the pH in the stomach because HCl production is not in place and lactic acid produced from lactose is decreasing because of the removal of sow milk. The pH in the stomach remained above 4.5 during the first hours after a meal in piglets at 2 weeks after weaning (weaned at ~24 days of age; in-house study) while a pH of 3 is considered optimal for stomach enzymes (Heo et al., 2013). A low stomach pH is important (1) to reduce the survival of pathogens and, thereby, also the flow of pathogens into other parts of the gastrointestinal tract, (2) activation of protein digestive enzymes (i.e., pepsinogen to pepsin) resulting in better gastric protein predigestion with less protein flowing into the large intestine providing nutrients to pathogens, and (3) releasing pancreatic enzymes for the digestion of e.g., starch and fat (Heo et al., 2013). The latter occurs when digesta with a low pH enters the duodenum. Stomach retention time and acidification are known to be influenced by soluble fibres (in-house study) and particle size of raw materials (Kiarie and Mills, 2019). Recently, we have developed a laboratory method to determine the buffering capacity of raw materials. Certain feed ingredients (e.g., calcium salts) have high buffering capacity, i.e., need large amounts of HCl to reduce the pH, while others (e.g., organic acids) have low buffering capacity. We aim to steer towards a diet formulation that helps piglets regulate the stomach pH in order to enhance gastric barrier function and increase digestibility of nutrients. In an in-house study, we determined the effect of buffering capacity on growth performance in order to determine recommendations for feed formulation. We found that the buffering capacity in typical diets is able to support piglet growth. Although the diets were similar in amino acids to energy ratio, we did observe

differences in the feed efficiency (i.e., amount of feed needed for growth). Thus, we hypothesize that dietary buffering capacity can impact the piglet's physiology via changes in protein digestion in the stomach and an imbalance in the presence of amino acids and energy after absorption. This study was done under optimal environmental conditions (i.e., low disease pressure, low animal density), and it can be hypothesized that the optimal dietary buffering capacity differs in suboptimal (i.e., low sanitary conditions or high pathogenic load) conditions. Thus, there is a need to better understand the role of the stomach to optimize health of the gastrointestinal tract and reduce PWD.

The extent and rate (i.e., kinetics) of protein, starch and fat digestion can be affected by stomach functioning. There is, thus, a complicated interaction between stomach functioning and nutrient availability with effects on nutrient utilization and subsequent nutrient losses in faeces and urine. In this project, we aim to unravel this interaction, especially in the period after weaning.

#### **Translation of results from experimental conditions to field farm conditions**

Studying the effect of nutritional strategies on PWD on commercial farms is difficult because of variability in the incidence of PWD and uncontrolled pathogenic pressure. Moreover, different husbandry systems impose a variety of environmental challenges for piglets leading to a subclinical disease state. These conditions include level of ventilation, temperature control, humidity, presence of dust, faeces, etc. and with that the related pathogen load (airborne or soil). Regarding specific pathogens, *E. coli* is the main bacteria involved in causing PWD, but its occurrence is variable on different farms. The variability in responses would increase the number of animals needed to show the efficacy of a nutritional strategy when experiments are conducted at field farms. Our research facility is well maintained, and the climate and sanitary conditions are controlled and do not represent the average commercial farm. For this reason, we recently designed and operate a separate unit at our research facility. This unit contains four fully isolated rooms having their own climate control system (state-of-the-art ventilation and temperature installations). In this way, we can perform studies where we can mimic commercial farm conditions. Its design allows challenge studies with specific pathogens in one room without running the risk of spreading the infection to other rooms and to the rest of our facility. An *E. coli* challenge model has recently been validated and used to test different nutritional strategies. It specifically induces an increase in diarrhoea immediately after weaning and as such is a good model for studying effects of nutritional strategies on gastrointestinal distress resulting in PWD. We have multiple years of experience with this model and the procedure is documented as standard operating procedure in our company. During this procedure, piglets are challenged with pathogenic *E. coli* (O149:F4ac) according to a method described in Roubos-van den Hil et al. (2017). Piglets are tested for susceptibility or resistance towards ETEC O149:F4ac by a DNA marker-based test on biological samples collected during the suckling phase. This is done to ensure that only susceptible piglets will be used, which means a reduction in variation in the outcomes and, thus, in the number of animals needed to show an effect.

While the *E. coli* challenge model is specific for gastrointestinal distress, many field farms also experience subclinical diseases coming from more general suboptimal housing and sanitary status. In order to develop and validate a model mimicking this suboptimal housing, we have conducted a validation experiment testing climate and sanitary parameters involved in the so-called management model. In this first experiment, we tested multiple options for a proper model. However, there is a need for a follow-up study to further validate this model (to be used up to 25 kg body weight) and develop a standard operating procedure for this unit. An older protocol for a management model included increased ventilation by shortening the P-band by 2°C (=P-band is the range in which the ventilation is steered from minimum to maximum), suboptimal temperature (2°C lower than standard settings), spreading of dust, and spreading of sow manure. However, these parameters showed to be insufficient to mimic the conditions on commercial farms. Recently, other research groups were able to reproduce a sanitary model (e.g., Van der Meer et al., 2016 and Le Floc'h et al., 2009) and parameters in those models (e.g., frequent spreading of manure from different batches of pigs) could be tested to improve our old protocol. Both the *E. coli* challenge model and management model resemble conditions on commercial farms. The most promising nutritional strategies will first be tested under the controlled *E. coli* challenge model and/or management model and subsequently under commercial conditions on field farms around the world to further validate the results. This needs to be done to ensure that the nutritional strategies also work with e.g., different management, genetics, dietary (raw material) composition.

## References

- Bruininx, E.M.A.M., G.P. Binnendijk, C.M.C. van der Peet-Schwering, J.W. Schrama, L.A. den Hartog, H. Everts, and A.C. Beynen. 2002. Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs. *Journal of Animal Science* 80:1413-1418.
- Buchet, A. C. Belloc, M. Leblanc-Maridor, and E. Merlot. 2017. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PLoS ONE* 12(5):e0178487.
- Choudhury, R., A. Middelkoop, J. Boekhorst, W.J.J. Gerrits, B. Kemp, J.E. Bolhuis, and M. Kleerebezem. 2021a. Early life feeding accelerates gut microbiome maturation and suppresses acute post-weaning stress in piglets. *Environmental Microbiology*, 23(11): 7201-7213.
- Choudhury, R., A. Middelkoop, J.G. de Souza, L.A. van Veen, W.J.J. Gerrits, B. Kemp, J.E. Bolhuis, and M. Kleerebezem. 2021b. Impact of early-life feeding on local intestinal microbiota and digestive system development in piglets. *Scientific reports* 11:4213, doi.org/10.1038/s41598-021-83756-2.
- Cranwell, P.D., D.E. Noakes, and K.J. Hill. 1976. Gastric secretion and fermentation in the suckling pig. *British Journal of Nutrition* 36:71-86.
- Heo J.M., J.C. Kim, C.F. Hansen, B.P. Mullan, D.J. Hampson, and J.R. Pluske. 2009. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Journal of Animal Science* 87:2833-2843.
- Heo, J.M., F.O. Opapeju, J.R. Pluske, J.C. Kim, D.J. Hampson, and C.M. Nyachoti. 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97:207-237.
- Huting, A.M.S., A. Middelkoop, X. Guan, and F. Molist. 2021. Using nutritional strategies to shape the gastro-intestinal tracts of suckling and weaned piglets. *Animals* 11, 402, doi.org/10.3390/ani11020402.
- Jensen, M.S., S.K. Jensen, and K. Jakobsen. 1997. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *Journal of Animal Science* 75:437-445.
- Kiarie, E.G. and A. Mills. 2019. Role of feed processing on gut health and function in pigs and poultry: conundrum of optimal particle size and hydrothermal regimens. *Frontiers in Veterinary Science* 6:19 doi: 10.3389/fevts.2019.00019.
- Kim, J.W., B. Koo, and C.M. Nyachoti. 2021. Pigs weighing less than 20 kg are unable to adjust feed intake in response to dietary net energy density regardless of diet composition. *Canadian Journal of Animal Science* 101:118-125.
- Koopmans, S.J., A.C. Guzik, J. van der Meulen, R. Dekker, J. Kogut, B.J. Kerr, and L.L. Southern. 2006. Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 84:963-971.
- Le Floc'h, N., L. LeBellego, J.J. Matte, D. Melchior, and B. Sève. 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 87:1686-1694.
- Pluske, J.R., D.J. Hampson, and I.H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51(1-3): 215-236.
- Resink, J.W., W.J.J. Gerrits, T.G. Hulshof, N. Deutz, and G. Ten Have. 2022. P215 Higher amino acid demand in portal drained viscera of post-wean piglets. *Animal – Science Proceedings* 13: 157-226.
- Roubos-van den Hil, P.J., R. Litjens, A.-K. Oudshoorn, J.W. Resink, and C.H.M. Smits. 2017. New perspectives to the enterotoxigenic *E. coli* F4 porcine infection model: Susceptibility genotypes in relation to performance, diarrhoea and bacterial shedding. *Veterinary Microbiology* 202:58-63.
- Trevisi, P., E. Corrent, M. Mazzoni, S. Messori, D. Priori, Y. Gherpelli, A. Simongiovanni, and P. Bosi. 2015. Effect of added dietary threonine on growth performance, health, immunity and gastrointestinal function of weaning pigs with different genetic susceptibility to *Escherichia coli* infection and challenged with *E. coli* K88ac. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99:511-520.

Van Hees, H.M.J., S.A. Ballari, L. Dieste-Pérez, B.N. Carpinetti, and G.P.J. Janssens. 2022. Diet and stomach characteristics of feral pigs (*Sus scrofa*): implications for farmed piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition in press*, <https://doi.org/10.1111/jpn.13726>.

Van Der Meer, Y., A. Lammers, A.J.M. Jansman, M.M.J.A. Rijnen, W.H. Hendriks, and W.J.J. Gerrits. 2016. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. *Journal of Animal Science* 94:4704-4719.

Wellington, M.O., J.K. Htoo, A.G. Van Kessel, and D.A. Columbus. 2019. Estimating the optimal threonine requirement for 25-50 kg pigs fed a mixture of soluble and insoluble dietary fibre. *Canadian Journal of Animal Science* 99:634-638.

Wellington, M.O., R.B. Thiessen, A.G. Van Kessel, and D.A. Columbus. 2020. Intestinal health and threonine requirement of growing pigs fed diets containing high dietary fibre and fermentable protein. *Animals* 10:2055.

### 3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The ultimate goal of this project is to develop nutritional strategies that will better meet the requirements of piglets before, around, and after weaning in optimal and sub-optimal (including pathogenic pressure) environments. With these nutritional strategies, we aim to increase the sustainability of pig production by helping to reduce mortality rate and the use of antibiotics, by using raw materials that meet animal requirements, by supporting feed intake and gastrointestinal tract development around weaning, and by improving animal welfare for example by reducing abnormal behaviour (tail, biting, belly nosing).

The immediate goals are:

1. To validate a management model that simulates commercial conditions but in a controlled environment (Appendix 2).
2. To determine the optimal lysine to energy ratio and energy level in piglets after weaning (Appendix 1).
3. To determine the effect of creep feed, fatty acid level and fatty acid composition on fat digestibility, bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development, and blood lipid metabolite profile after weaning (Appendix 1). Socializing the piglets before weaning might be used as model to reduce weaning stress and, thus, to disentangle the effect of stress from feed transition (sow milk to solid feed) from social stress (mixing of piglets) on fat digestibility. The optimal fatty acid level and fatty acid composition will also be determined under suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) in order to translate the knowledge into practical conditions.
4. To determine the optimal ratio between unsaturated and saturated (U:S ratio) fatty acids on fat digestibility under optimal (Appendix 1) and suboptimal sanitary conditions (Appendix 2).
5. To determine the interaction between dietary protein level and specific amino acids requirements under optimal and suboptimal sanitary conditions. Nitrogen balance experiments will be done to determine protein deposition under optimal and suboptimal sanitary conditions (Appendix 4). The optimal protein and amino acid levels will be verified in a growth performance trial under optimal (no animal experiment) and suboptimal sanitary conditions (Appendix 2).
6. To determine the interaction between feed particle size and the optimal inclusion level of coarse raw materials in the diet given before and after weaning on stomach and intestinal development and nutrient digestibility after weaning under optimal (Appendix 1), suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) and a specific pathogen challenge (*E. coli* challenge model; Appendix 3).
7. To determine the effect of feed form (mash, pellet, crumble, extruded feed) and transition between feed forms at weaning on gastrointestinal development and health (Appendix 1).
8. To determine the optimal buffering capacity in diets for piglets after weaning under suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) conditions. Optimal levels under optimal conditions were already established in an in-house study.

9. To determine the interactive effect between buffering capacity and feed particle size distribution on gastrointestinal development and health (Appendix 1).

Next to the response parameters specified in the appendices, we will also evaluate sustainability metrics when applicable. The metrics are divided in diet-related and animal-related metrics. Diet-related: resource (use of fossil fuel) and water use, environmental acidification, nitrogen and phosphorus excretion during pig production, CO<sub>2</sub> emission from transport of raw materials or from raw material production itself. Animal-related: behaviour scores, body condition scores, mortality, and morbidity.

### 3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We are an international animal nutrition company that develops nutritional additives and feeding strategies for most livestock species. The company has the ambition to be a global leader in this field. Our focus area is sustainable livestock farming which for us includes reducing antibiotic use, improving animal health and welfare, and reducing environmental burden of livestock production by e.g., reducing nutrient losses in urine and faeces and reducing emissions associated with production. The need to go for a more circular food production system could also lead to the use of feed with lower nutrient availability/digestibility, which increases the need for additives and more in-depth knowledge on nutrient delivery. This will allow for improved digestion and utilization of raw materials with lower nutrient availability/digestibility. Our company has a dedicated R&D department with research teams for all species in scope, including pigs. Each species team has around 6 research scientists holding a PhD related to animal or veterinary science and they maintain a broad international science network. Studies will be performed at our research centre in The Netherlands. We have recently invested in a state-of-the-art unit where we can perform trials that mimic and control specific environmental conditions (as described above in section 3.1 Background). High biosecurity and hygiene standards are maintained to protect our personnel and animals. Daily care of animals, measurements, and experimental techniques are performed by certified competent and experienced staff. Competence of personnel is controlled by a ISO9001 quality management system and our animal welfare body. The company has state-of-the-art and GLP certified laboratory facilities with a range of assays and technologies, including *in vitro* techniques for first screening. Project results will be disseminated through scientific journals and conferences and ultimately translated into nutritional strategies applied via our global network of nutritionists.

### 3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

## 3.3 Relevance

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

The scientific relevance of the immediate goals is to better understand the piglet's requirements around weaning which is one of the most stressful events in a pig's life. The lack of understanding of the physical state and the variable response to weaning of the post-weaning piglet makes it challenging for nutritionists to establish an optimal diet. However, there are certain aspects that are similar between piglets: they all need energy to survive, nutrients to develop their gastrointestinal tract, and need adequate nutrition to combat pathogens and stay healthy. Moreover, changes in legislation, e.g., the expected ban on tail docking and use of in-feed antibiotics and pharmacological levels of zinc oxide, stress the need to understand the nutritional requirements of piglets in this phase, also to prevent damaging behaviours. Nutrient requirements for weaned piglets are mostly extrapolated from older pigs and we have just started to unravel the complex physiology of a piglet around weaning and its accompanying nutrient requirements. Results from the immediate project goals will be used to further optimize piglet feeding strategies internally but our results will also be published in scientific journals.

Regarding the social relevance of the ultimate goal, main aspects are to further reduce reliance on antibiotics for pigs in order to maintain future availability of antibiotics for human medicine. Secondly, this project will contribute to the use of non-human-edible feed ingredients (e.g., co-products from food production) for feed, leaving human-edible ingredients available as food.

### 3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

**Target animals (piglets):** Go through the weaning process with less nutritional stress and having an improved (gastrointestinal) development after weaning. In this way, have a lower risk for diseases incidence, remain healthier after weaning, and have lower mortality.

**Experimental animals (piglets):** Contribute to research needed to study nutritional requirements around weaning more in-depth. Violation of piglet integrity by housing conditions (specifically without bedding), housing under suboptimal sanitary conditions, or challenge with a pathogen.

**License holder:** Increase the sustainability of pig production and improve animal health and welfare. Be able to provide optimized nutritional strategies for feeding piglets before and after weaning to farmers. The license holder also has an economic interest to market high-end piglet feeds and nutritional advice to farmers.

**Researchers:** Increase their understanding of the weaning process and the nutritional requirements of piglets around weaning. Moreover, to publish the results of this project in scientific journals.

**Environment:** Reduce nitrogen and phosphorus excretion into the environment. More efficient use of raw materials and to reduce the competition between food and feed and reduce fossil fuel and water resource use.

**Pig industry:** Increase its sustainability by increased piglet robustness, resilience to weaning and sanitary stressors, reduced damaging behaviours, PWD, antimicrobial use, and mortality around weaning.

Increased economic sustainability by increasing the flexibility to use raw materials based on nutrient values and costs.

**Farmer:** Smoother weaning process of piglets and lower veterinary costs, resulting in a sustainable income from less morbidity and mortality. Improved growth performance of their herd as result from lower morbidity and mortality and improved nutrient delivery.

**Society:** Increase animal wellbeing and higher environmentally sustainable pig production. Reduce the reliance on antimicrobials in pig production and, thereby, reduce the risk of antibiotic resistance for humans.

## 3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

To answer the immediate goals specified in 3.2.1, a total of 18 animal experiments are designed. The design of the project is schematically represented below, to be interpreted from top to bottom. Go/no-go decisions on continuation of specific studies within this project are made by a dedicated project team. This project team consists of researchers, nutritionists, and people working in the company's sustainability, regulatory, and marketing departments. Together, they decide on the continuation of a project based on pre-set key performance indicators set. The key performance indicators are:

1. **Growth performance:** does one of the tested nutritional strategies maintain or even increases feed intake to a level that is adequate to support or improve growth and health. Growth performance is an indirect, easy to measure parameter on commercial farms. It is indicative for feed intake, health, and overall wellbeing and, therefore, an important parameter to measure. The immediate goals listed in 3.2.1 aim to further understand and enhance specific aspects of (digestive) physiology. This will ultimately result in changes in growth and/or feed intake.
2. **Sustainability metrics:** does one of the tested nutritional strategies improve sustainability by e.g., reducing antibiotic use, reducing mortality, or increase the use of more sustainable raw materials and increasing feed efficiency (i.e., reducing nutrient losses into the environment).
3. **Animal health and welfare metrics:** does one of the tested nutritional strategies lead to lower occurrence of PWD or better body condition scores including reducing damaging behaviours.

Per indicator and per experiment, a goal in percentage increase or reduction will be set, e.g., the nutritional strategy should increase feed intake by X% compared to a control or reduce antibiotic use by

X%. This goal depends on the theoretical potential of a nutritional strategy and, thus, a general number cannot be provided here. When the set percentages are not met, it is unlikely that a nutritional strategy will be continued.

For goals 2-4 (energy) and 6-9 (gastrointestinal development), a series of experiments (1-9) are designed that relate to the respective immediate goals using a Nutrient utilization model (Appendix 1). Results of exp. 1-9 will be discussed in the project team that decides on go/no-go with experiments under suboptimal sanitary conditions (Management model; Appendix 2) and/or subsequently using an *E. coli* challenge model (*E. coli* challenge model; Appendix 3) based on the predetermined key performance indicators. Validation of the management model is required before exp. 13-17 can start. This will be done in exp. 12 (goal 1; Appendix 2). After exp. 12, a go/no go decision needs to be made on the validity of the management model.

For goal 5, first one experiment will be conducted under optimal conditions (exp. 10; Appendix 4). A go /no go decision has to be taken before moving to exp. 11 which has a similar experimental design as exp. 10 but then under health challenge conditions (suboptimal sanitary conditions). Experiment 11 (nitrogen balance under suboptimal sanitary conditions) can only be done if experiment 12 (development of management model) is successful. With this project governance structure, only the most promising nutritional strategies will be tested in challenge models (Management model and *E. coli* challenge model). The nutritional strategies will ultimately be validated in large-scale field trials (non-animal experiments).

Energy Goals 2-4	Gastrointestinal development: acidification and fibres Goals 6-9	Protein level and amino acid ratio's Goal 5
---------------------	--	---

*Hypotheses creation based on literature studies, in vitro testing (digestibility or buffering capacity), existing in-house in vivo studies*

<i>Appendix 1: Nutrient utilization model (n=888)</i>		<i>Appendix 4: Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions (n=160)</i>
Exp. 1 Energy level × lysine/energy ratio	Exp. 6 Fibre coarseness × start of feeding before weaning	Exp. 10 Protein level × amino acid level optimal conditions
Exp. 2 Feed level × lysine/energy ratio	Exp. 7 Inclusion level coarse raw materials before and after weaning	<b>GO/NO GO DECISION MOMENT</b>
Exp. 3 Creep feed effect on fat digestion	Exp. 8 Feed form	Exp. 11 Protein level × amino acid level suboptimal sanitary conditions
Exp. 4 SCFA+MCFA source × level	Exp. 9 Buffering capacity × coarseness	
Exp. 5 U:S ratio dose-response		
<b>GO/NO GO DECISION MOMENT</b>		
<i>Appendix 2: Management model (n=1254)</i> Exp. 12: development of management model = <b>Goal 1</b>		



<b>GO/NO GO DECISION MOMENT ON MANAGEMENT MODEL</b>				
Exp. 13 SCFA+MCFA source × level	Exp. 15 Optimal strategy regarding coarseness before and after weaning with suboptimal conditions after weaning	Exp. 17 Protein +amino acids level × housing conditions (optimal vs suboptimal)		
Exp. 14 U:S ratio dose-response	Exp. 16 Buffering capacity under suboptimal conditions			
<b>GO/NO GO DECISION MOMENT</b>				
<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;"><i>Appendix 3: E. coli challenge model (n= 207)</i></td> </tr> <tr> <td>Exp. 18 Optimal strategy regarding coarseness before and after weaning with pathogen challenge conditions after weaning</td> </tr> </table>			<i>Appendix 3: E. coli challenge model (n= 207)</i>	Exp. 18 Optimal strategy regarding coarseness before and after weaning with pathogen challenge conditions after weaning
<i>Appendix 3: E. coli challenge model (n= 207)</i>				
Exp. 18 Optimal strategy regarding coarseness before and after weaning with pathogen challenge conditions after weaning				
<i>Validation studies under field conditions</i>				

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Hypotheses of each experiment are based on available knowledge (literature or earlier in-house studies). When possible, *in vitro* studies will first be conducted to find the most promising combinations of, for example, unsaturated to saturated fatty acid ratios. Those will subsequently be used in *in vivo* experiments. Only the nutritional strategies that showed promising effects under optimal sanitary conditions will be tested in the management and/or *E. coli* challenge models. In this way, the number of animals and discomfort per animal will be minimized. The management model will be validated first prior to using this model to test nutritional strategies. The results obtained from the validation trial will be used to calculate the exact number of animals needed to find the relevant difference. This will also reduce the number of animals.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Nutrient utilization model
2	Management model
3	<i>E. coli</i> challenge model
4	Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions
5	
6	
7	
8	
9	



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0800-7890789).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

§ 1 lid 2n

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

§ 1 lid 2n

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Nutrient utilization model

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This model is used to study the nutrient utilization of energy, protein, fat, and fibres but also the effect of fat and fibres on gastrointestinal development. Sampling blood and/or different parts of the gut will provide more insight into the dynamics of digestion and the locations where different nutrients are released and absorbed by the gut. In order to study digestibility and retention time of feed in specific parts of the gastrointestinal tract, known amounts of markers will be fed to the piglets (e.g., chromium EDTA as soluble marker and insoluble ash as in-feed marker). By sampling digesta contents of different sections of the gastrointestinal tract, digestibility and retention time for each section can be determined. When for example ileal contents are sampled, ileal apparent digestibility data will be obtained, which can be used for formulating more optimal diets because the requirements are also expressed on an ileal digestibility basis. Sampling faecal material is needed to study the overall nutrient digestion and gives an indication of the absolute requirement. The primary outcome parameter depends on the goal of the experiment. Experiments 1-8 will be done under this Appendix. The treatments will be given during pre-weaning or at maximum 3 weeks after weaning since that is the most sensitive period in a piglet's life.

#### *Experiment 1*

Treatments after weaning: 2 energy levels × 5 levels of lysine/energy ratios = 10 experimental diets.

- The energy levels are at the borders of the current recommendations while some of the tested lysine/energy ratios might fall outside current recommendations, i.e., either lower or higher.

Sampling: Blood samples from a subset of animals to determine plasma urea nitrogen as measure for protein deposition. Faecal samples to determine protein and energy digestibility.

Main outcome parameter: growth; blood and faecal samples will help to explain observed growth responses.

#### *Experiment 2*

Treatments after weaning: 3 lysine/energy levels (based on Exp 1) × 3 feeding levels (80, 90 and 100% of ad libitum feed intake). Feed intake might be restricted in praxis and in this way, we validate our nutritional strategies under more commercial-like conditions.

Main outcome parameter: growth; no other samples will be taken.

#### *Experiment 3*

Treatments before weaning: socializing piglets by combining litters (i.e., open fences between farrowing crates) and with or without creep feed. Thus, 4 treatments before weaning: social or traditional and creep feed or no creep feed.

Treatments after weaning: 1 experimental diet.

Sampling: blood, gastrointestinal content, pancreatic + gastrointestinal tissue at 4 timepoints around weaning. Faecal sampling in the period after weaning.

Main outcome parameter: fat digestibility at the end of the ileum; other parameters, such as bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development (weight, length, histology), blood lipid metabolite profile, will help to explain the observed effects on fat digestibility.

#### *Experiment 4*

Treatments before weaning: socializing piglets by combining litters (i.e., open fences between farrowing crates). Thus, 2 treatments before weaning: social or traditional.

Treatments after weaning: 3 SCFA+MCFA composition × 3 SCFA+MCFA levels = 9 experimental diets.

Sampling: blood, gastrointestinal content, pancreatic + gastrointestinal tissue. Faecal sampling in the period after weaning.

Main outcome parameter: fat digestibility at the end of the ileum; other parameters, such as bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development (weight, length, histology), blood lipid metabolite profile, will help to explain the observed effects on fat digestibility.

#### *Experiment 5*

Treatments after weaning: 4 ratios of unsaturated:saturated fatty acids in dose-response.

Sampling: gastrointestinal content, pancreatic + gastrointestinal tissue. Faecal sampling in the period after weaning.

Main outcome parameter: fat digestibility at the end of the ileum; other parameters, such as bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development (weight, length, histology), blood lipid metabolite profile, will help to explain the observed effects on fat digestibility.

#### *Experiment 6*

Treatments before weaning: 3 levels of coarseness of the diet × 2 starting times of feeding = 6 experimental treatments.

Treatments after weaning: same level of coarseness as before weaning = 3 experimental diets.

Sampling: gastrointestinal development, e.g., acidification, ulceration of the stomach and length, weight and histomorphology of different parts of the gastrointestinal tract, and gastrointestinal content at and after weaning.

Main outcome parameter: nutrient digestibility at the end of the ileum; other parameters determined from the gastrointestinal samples will help to explain observed effects on nutrient digestibility.

#### *Experiment 7*

Treatments after weaning: 3 inclusion levels coarse raw materials before weaning × 3 inclusion levels coarse raw materials after weaning = 9 experimental diets.

Sampling: gastrointestinal development, e.g., acidification, ulceration of the stomach and length, weight and histomorphology of different parts of the gastrointestinal tract, and gastrointestinal content at and after weaning.

Main outcome parameter: nutrient digestibility at the end of the ileum; other parameters determined from the gastrointestinal samples will help to explain observed effects on nutrient digestibility.

#### *Experiment 8*

Treatments after weaning: 3 feed forms (mash, pellet, extruded feed) before weaning × 3 feed forms (mash, pellet, extruded feed) after weaning = 9 experimental diets.

Sampling: gastrointestinal development and gastrointestinal content at and after weaning. Faecal sampling in the period after weaning.

Main outcome parameter: nutrient digestibility at the end of the ileum; other parameters determined from the gastrointestinal samples (e.g., retention time) will help to explain observed effects on nutrient digestibility.

#### *Experiment 9*

Treatments after weaning: 2 levels of buffering capacity × 2 levels of coarseness (standard vs optimized from Exp 5 and 6) = 4 experimental diets.

Sampling: gastrointestinal development, e.g., acidification, ulceration of the stomach and length, weight and histomorphology of different parts of the gastrointestinal tract, and gastrointestinal content after weaning.

Main outcome parameter: nutrient digestibility at the end of the ileum; other parameters determined from the gastrointestinal samples (e.g., retention time) will help to explain observed effects on nutrient digestibility.

---

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

---

Proposed animal procedures all experiments:

1. Before weaning, piglets will be individually ear-tagged and birth weights will be recorded. Creep feed will be given as free-choice. Piglets will be weaned at a minimum age of 21 days old into specialised housing which are cleaned before entering of a new group and which is separated from housings where the sows are kept (Council Directive 2008/120/EC).
2. Piglets will be housed in groups of 3-6 piglets depending on the barn/pen sizes to be used.
3. Housing without bedding for maximally 6 weeks after weaning. This is required to properly assess the effects of the nutritional strategies. Consumption of bedding materials (e.g., high in fibre) might interfere with the response leading to more variation and a higher number of animals required to show an effect.
4. Animal weighing every 7 days for a maximum of 10 weeks (before and after weaning periods).

Additional animal procedure experiment 1:

5. Blood sampling; maximal 6 times within 6 weeks after weaning with a maximum 10 mL and of 8ml/kg/14 days for young animals. Route: intravenous.

Additional animal procedure experiment 2:

6. Feed restriction at 80% of ad libitum intake combined with lysine/energy levels below currently known requirements (5 treatments in total).

Additional animal procedure experiment 3-4:

7. Socializing before weaning.

Additional animal procedure experiment 3, 4 and 6:

8. Faecal swab to determine if a piglet had eaten the creep feed. A colorant will be added to the feed for 3 days and a faecal swap will be taken after those days to determine the presence of the colorant in faeces.

Additional animal procedure experiments 3-9:

9. Euthanasia for the sampling of digesta from the different sections of the gut and tissue sampling in order to determine digestibility / retention time / enzyme production. Euthanasia can take place before (reference samples in Exp 3) and after weaning. A blood sample can be taken just before euthanasia when animals are sedated.
10. Imposed feeding pattern to get a continuous flow of digesta through the gastrointestinal tract after weaning. A feeding pattern means that the total feed typically eaten is provided in smaller meals throughout the day instead of free access to feed. The amount of feed to be given will be determined based on feed intake of individual piglets (average of previous studies) and will always be above the level needed for maintenance.

Additional animal procedure experiments 1, 3, 4, 5 and 8:

11. Faeces sampling via rectum stimulation; maximal 7 times in the experimental period of 10 weeks (before and after weaning periods) with max 2 samples taken before weaning and max 5 samples after weaning.

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

Digestibility studies are done by measuring the loss of nutrients in the gut with the help of inert digestibility markers such as insoluble ash. Therefore, the individual pig is the experimental unit. Analysis in blood samples (experiment 1), are also on individual pig level. The relevant outcome parameter will be taken (e.g., protein digestibility) and error variances from previous studies will be used to estimate sample size at a power of 80% and a probability of 95%. This will be done for every experiment.

*For example, ileal protein digestibility*

500 studies are simulated in a statistical software package using relevant digestibility means ranging between 60 and 80%. We aim to detect an absolute difference of 7 percentage-points within this range of digestibility means. Previous studies with nutritional strategies have shown that we can get this difference in our facility. The 500 simulations are, thereafter, analysed using a linear mixed model (MIXED) which is also the model used to analyse the data after a study is completed. The proportion of simulations showing a significant treatment effect should be >80% in order to ensure a power of 80% and a probability of 95%.

Error variance = 19.96

Mean digestibility = 70 with absolute differences ranging from 0-12 (mean range = 58 – 82%)

Relevant difference = 6

Number of replicates per treatment = 10. However, piglets at a young age might not have sufficient digesta at the end of the small intestine for chemical analyses or a piglet might need to be removed from a study (e.g., feed intake below specified criteria or death). Therefore, sample size is estimated to be  $10 + 2 = 12$  in total per treatment in order to maintain sufficient power.

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Sus scrofa	Own facility	Pre-/weaned piglets	888	Males and females	No	Hypor Libra × Hypor Maxter

Provide justifications for these choices

Species	Sus scrofa is the target species
Origin	We have our own facility with a sow herd, where we breed our own piglets
Life stages	Piglets before and after weaning up to 6 weeks after weaning are the target group
Number	Total experimental treatments experiment 1-9 is 72 (Exp 1: 10, Exp 2: 5 (3 with 80% of ad libitum feeding and 2 with lysine/energy below current recommendations), Exp 3: 16 (4 timepoints × 4 diets), Exp 4: 9, Exp 5: 4, Exp 6: 6, Exp 7: 9, Exp 8: 9, and Exp 9: 4). In Exp 3, 12 socialized piglets and 12 traditionally housed piglets will form the reference sample group. 72 treatments × 12 piglets/treatment + 24 reference piglets (Exp 4) = 888 piglets in total
Gender	Males and females are representative for the commercial situation
Genetic alterations	Not applicable
Strain	This strain is present at our own facility and representative of the commercial situation

## C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

X No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

During the pre-weaning phase of the experiment piglets will be housed in conventional farrowing crates together with the dam.

Piglets will be housed without bedding material because intake of bedding material interferes with the measurements to be made via effects on nutrient digestibility. Variations in intake of bedding material between animals will also increase variation in outcome parameters and, thus, increase the number of animals needed to show an effect. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor to provide comfortable resting places.

Part of the animals will be fed restrictedly to mimick commercial praxis. Part of the animals will be fed below currently known amino acid requirements in order to establish the optimum amino acid level.

#### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Blood sampling might induce pain, but no sedation will be used. A single insertion of a needle to sample blood is not expected to cause severe pain and the duration is short.

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

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

Piglets will not get bedding material in the pens. However, we expect little adverse effects because other (non-edible) pen enrichment will be present.

The imposed feeding pattern is not expected to result in adverse effects on animal welfare since the animals will be fed their daily amount (always above their requirements for maintenance) but then divided across a day. The feeding level at 80% of ad libitum feed intake might result in adverse effects.

Explain why these effects may emerge.

Diets are designed to provide the recommended nutrients when given ad libitum.

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

The lower feeding level will be given for a maximum of 3 weeks after weaning. Care will be given that all vitamin and mineral requirements will be met even at this lower feeding level.

#### E. Humane endpoints

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

X No > Continue with question F

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

Indicate the likely incidence.

#### F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

1. Ear tagging: less than mild (standard commercial procedure)
2. Group housing: less than mild
3. Housing without bedding: less than mild
4. Animal weighing: less than mild
5. Blood sampling intravenously (~13% of piglets): mild
6. Feed restriction at 80% of ad libitum / nutrients below requirements (~6% of piglets): mild
7. Socializing before weaning: less than mild
8. Faecal swab: less than mild
9. Euthanasia after sedation (~79% of piglets): mild
10. Imposed feeding pattern: less than mild
11. Faeces sampling: less than mild

The expected level of discomfort is mild for all animals (n=888).

#### G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>We have an in-house in vitro digestion kinetics model in which we can screen raw materials and diets. Wherever possible, first a screening with this model will be done in order to select the raw materials and diets to be tested in in vivo studies. Interactions between raw materials and /or nutrients on e.g., digestibility and nutrient utilization, passage through the gastrointestinal tract, and acidification in the stomach cannot be studied outside animals. Especially not in a weaned piglet where digestive physiology changes rapidly due to weaning. Animal data is also needed to validate the in vitro digestion kinetics model.</p> <p>Faecal samples could be obtained non-invasively but are not representative for what is happening in different parts of the gastrointestinal tract. For this project, the stomach and small intestine are the most important parts of the gastrointestinal tract. Changes in digestive physiology and the stress around weaning occurs in all husbandry systems.</p>
Reduction	<p>Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies and literature data (see 3.1 Background in the project proposal) to decide on the treatments to be studied. Go/no go decisions per nutritional strategy ensures that only the most promising strategies will be tested in follow-up studies, allowing for the reduction in the number of animals potentially required.</p>
Refinement	<p>Piglets after weaning are the target animals and their physiology cannot be obtained in other species or in models.</p> <p>Animals will be sedated before euthanasia.</p> <p>In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).</p> <p>Additional health checks will be done for experiment 2 when for the treatment where feed intake is restricted.</p> <p>Standard operating procedures will be used for faeces collection to reduce variation between studies.</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

X No

Vertrouwelijk

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

#### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

#### J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

### End of experiment

#### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Tissue and/or digesta from the gastrointestinal tract can only be sampled after euthanasia. Only a part of the animals will be euthanised. The other animals will be kept at our own research facility or sold to a commercial fattening farm.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.



Overdose of barbiturate after sedation

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0800-7890789).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
2	Management model

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

##### *Experiment 12 development of management model*

In our old stable, we were able to find differences in growth, feed intake, and feed efficiency (growth obtained with a certain amount of feed) between piglets housed under standard conditions and piglets housed under suboptimal / management model conditions. Feed intake and growth are measures of animal wellbeing (i.e., if an animal feels sick it will not eat and grow) and feed efficiency is a measure for sustainability (i.e., how well nutrients are used by the animal and thus not lost in urine and faeces). Last year we performed a small-scale study looking at several factors (body weight at weaning, spreading of dirt, partially closed vs open floor, lowering temperature) to start validating the old model in our new barn. We did not use different types of diets and also the number of replicates per factor was too low (n=10) to draw firm conclusions regarding the model. A second study is, therefore, needed to further develop and verify the outcomes of the first study. In this study we will use different dietary treatments. Since this model is aimed at finding differences between nutritional strategies, we also need to validate this first before we continue to test new nutritional strategies.

Treatments after weaning: 2 commercial-like diets × 3 housing conditions = 6 treatments.

- The housing conditions will be the optimal conditions (as control treatment) and the 2 most promising combinations of factors from the previous study (2 test treatments).

Sampling: blood for inflammatory markers and faeces for protein digestibility (as reduced protein digestibility is a main driver for post-weaning diarrhoea).

Main outcome parameter: inflammatory response in blood (e.g., haptoglobin). Faecal sampling will be done to verify the model. Growth response and diarrhoea incidence will be also be determined.

This study will be used to determine the residual variance which is required to do power and sample size calculations for subsequent studies. After the model is validated, we will use it for experiments 12-16 in which we want to examine the effect of nutritional strategies under sub-optimal conditions where the pathogenic pressure is long-lasting (up to 2 weeks after weaning). Moreover, poor management conditions immediately after weaning are expected to influence feed intake during the first 24-48 hours after weaning which might result in a higher occurrence of post-weaning diarrhoea.

The measurements and sampling in this experiment (no. 12) are needed to verify the outcomes of the first study (executed last year) and necessary to develop a standard operating procedure. This standard operating procedure will subsequently be used for experiments 13-14 and 11 which is in Appendix 4.

#### *Experiment 13*

Treatments before weaning: socializing piglets by combining litters (i.e., open fences between farrowing crates).

Treatments after weaning: 2 SCFA+MCFA composition × 2 SCFA+MCFA levels = 4 experimental diets.

- Composition and level based on Exp 3.

Sampling: blood, gastrointestinal content, pancreatic + gastrointestinal tissue. Faecal sampling in the period after weaning.

Main outcome parameter: fat digestibility at the end of the ileum; other parameters, such as bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development (weight, length, histology), blood lipid metabolite profile, will help to explain the observed effects on fat digestibility.

#### *Experiment 14*

Treatments after weaning: 2 ratios of unsaturated:saturated fatty acids.

- Ratios based on Exp 4.

Sampling: gastrointestinal content, pancreatic + gastrointestinal tissue. Faecal sampling in the period after weaning.

Main outcome parameter: fat digestibility at the end of the ileum; other parameters, such as bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development (weight, length, histology), blood lipid metabolite profile, will help to explain the observed effects on fat digestibility.

#### *Experiment 15*

Treatments before and/or after weaning: the 4 most promising nutritional strategies from Exp 5 and 6 will be used. This is regarding the level of coarseness, starting time of coarser feed before weaning, and inclusion level of coarse raw materials.

Sampling: gastrointestinal development, e.g., acidification, ulceration of the stomach and length, weight and histomorphology of different parts of the gastrointestinal tract, and gastrointestinal content at and after weaning.

Main outcome parameter: nutrient digestibility at the end of the ileum; other parameters determined from the gastrointestinal samples will help to explain observed effects on nutrient digestibility.

#### *Experiment 16*

Treatments after weaning: 4 diets with differing buffering capacity in a dose-response.

Sampling: gastrointestinal development, e.g., acidification, ulceration of the stomach and length, weight and histomorphology of different parts of the gastrointestinal tract, and gastrointestinal content at and after weaning.

Main outcome parameter: nutrient digestibility at the end of the ileum; other parameters determined from the gastrointestinal samples will help to explain observed effects on nutrient digestibility.

#### *Experiment 17*

Treatments after weaning: 2 combinations of amino acids and protein levels × 2 housing conditions (optimal vs management model) = 4 treatments of which 2 are regarded as animal experiment. The combinations of amino acids and protein levels are obtained in Exp 9 and 10.

Main outcome parameter: growth.

#### *All experiments*

Non-challenge control piglets receiving the same experimental diets will be included in experiments 12-16, but only non-invasive measurements will be done on these animals, i.e., growth, faecal sampling, fecal scoring for diarrhoea incidence.

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

Proposed animal procedures all experiments:

1. Before weaning, piglets will be individually ear-tagged and birth weights will be recorded. Creep feed will be given as free-choice. Piglets will be weaned at a minimum age of 21 days old into specialised housing which is separated from housings where the sows are kept (Council Directive 2008/120/EC).
2. Piglets will be housed in groups of 3 after weaning.
3. Housing without bedding for maximally 6 weeks after weaning. This is required to properly assess the effects of the nutritional strategies. Consumption of bedding might interfere with the response leading to more variation and a higher number of animals required to show an effect.
4. Animal weighing every 7 days for a maximum of 10 weeks (before and after weaning periods).
5. Management model with an average weaning age of 24 days (minimum 21 days): Factors in the management model that will be validated are e.g., reduced temperature (e.g., 2°C), increased ventilation (reduced P-band), spreading of manure, no disinfection of the unit before animals enter. The parameters will be incorporated in a standard operating procedure to ensure repeatability of the model.

Additional animal procedure experiment 12:

6. Blood sampling; maximal 6 times within 6 weeks after weaning with a maximum of 10 mL or 8ml/kg/14 days for young animals. Route: intravenous.

Additional animal procedure experiment 13:

7. Socializing before weaning.

Additional animal procedure experiment 13-16:

8. Euthanasia for the sampling of digesta samples from the gut and tissue sampling in order to determine digestibility / retention time / enzyme production. Euthanasia can take place before (reference samples in Exp 12) and after weaning. A blood sample can be taken just before euthanasia when animals are sedated.
9. Imposed feeding pattern to get a continuous flow of digesta through the gastrointestinal tract after weaning. A feeding pattern means that the total feed typically eaten is provided in smaller meals throughout the day instead of free access to feed. The amount of feed to be given will be determined based on feed intake of individual piglets (average of previous studies) and will always be above the level needed for maintenance.

Additional animal procedure experiment 12-14:

10. Faeces sampling via rectum stimulation; maximal 7 times in the experimental period of 10 weeks (before and after weaning periods) with max 2 samples taken before weaning and max 5 samples after weaning.

Example of a timeline for experiment 12:

Day in experiment	Procedure
Birth	Ear tag birth weight
~24 of age = day 0	Weaning into groups of 3: 4 groups of animals (2 per diet) housed under management model conditions and 2 groups of animals (1 per diet) housed in optimal conditions
Day 6	Blood sample + body weight
Day 10	Faecal sample
Day 13	Blood sample + body weight
Day 17	Faecal sample
Day 20	Blood sample + body weight
Day 27	Blood sample + body weight
Day 41 (=6 weeks after weaning)	Blood sample + body weight

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

Calculating sample size (power analysis) in order to minimise the number of animals needed per experiment will be determined based on the main outcome parameters. For experiment 12, it is based on haptoglobin concentrations in blood. For experiments 13-17, the power calculation is based on the amount of piglets needed to find an effect of the management model. For now, this will be based on growth but this might be adjusted based on outcomes of Exp 12.

#### *Experiment 12*

500 studies are simulated in a statistical software package using relevant differences in blood haptoglobin concentration found in a previous trial. The 500 simulations are, thereafter, analysed using a linear mixed model (MIXED) which is also the model used to analyse the data after a study is completed. The proportion of simulations showing a significant treatment effect should be >80% in order to ensure a power of 80% and a probability of 95%.

Error variance = 0.31

Mean haptoglobin concentration optimal conditions vs management model conditions (~day 14 after weaning) = 0.90 deviating between 0.70 vs 1.20 (based on in-house trial and Le Floc'h et al., 2009, J. Anim. Sci. 87:1686-1694; Van der Meer et al., 2016, J. Anim. Sci. 94:4704-4719; Van der Peet-Schwering et al., 2021, Wageningen Livestock Research, Public Report 1319)

Relevant difference = 0.60

Number of replicates per treatment = 15.

#### *Experiment 13-17*

Data from previous studies were used to estimate the expected mean, and error and block variances. 500 studies are simulated in a statistical software package using a mean growth of 460 g/d (day 0-42 after weaning) with differences ranging from 0-45 g/d. We aim to detect an absolute difference of 35. The 500 simulations are, thereafter, analysed using a linear mixed model (MIXED) which is also the model used to analyse the data after a study is completed. The proportion of simulations showing a significant treatment effect should be >80% in order to ensure a power of 80% and a probability of 95%.

Error variance = 1553

Block variance = 983

Mean = 460 g/d with absolute differences ranging from 0-45 (mean range = 415 – 505 g/d)

Relevant difference = 35 g/d

Number of replicates per treatment = 20.

### **B. The animals**

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Sus scrofa	Own facility	Pre-/weaned piglets	1254	Males and females	No	Hypor Libra × Hypor Maxter

Provide justifications for these choices

Species	Sus scrofa is the target species
Origin	We have our own facility with a sow herd, where we breed our own piglets
Life stages	Piglets before and after weaning up to 6 weeks after weaning are the target group

Number	<p>Experiment 12: 2 diets × 15 piglets = 30 piglets for control/optimal conditions (blood sample only).</p> <p>For the management model (procedure 5), experiments 12-17: 20 treatments (Exp 12: 4, Exp 13: 4, Exp 14: 2, Exp 15: 4, Exp 16: 4, and Exp 17: 2) in total. In Exp 13, 12 socialized piglets and 12 traditionally housed piglets will form the reference sample group. 20 treatments × 20 pens × 3 piglets + 24 reference piglets = 1224 piglets</p> <p>Total number of piglets 30 + 1224 = 1254</p>
Gender	Males and females are representative for the commercial situation.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	This strain is present at our own facility and representative of the commercial situation

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

X No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

During the pre-weaning phase of the experiment piglets will be housed in conventional farrowing crates together with the dam.

Piglets will be housed without bedding material because intake of bedding material interferes with the measurements to be made via effects on nutrient digestibility. Variations in intake of bedding material between animals will also increase variation in outcome parameters and, thus, increase the number of animals needed to show an effect. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor to provide comfortable resting places.

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Blood sampling might induce pain, but no sedation will be used. A single insertion of a needle to sample blood is not expected to cause severe pain and the duration is short.

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

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

Piglets might experience lung problems due to increased ventilation and reduced environmental temperature. The incidence of health issues (not specific for lung problems) in earlier trials with the management model was 4% of which lung problems were 0.3%. The 4% incidence of health issues is similar to other trials where no challenge was given to the animals. In literature, animals kept under low sanitary conditions for the entire fattening period (+/- 15 weeks) had higher pleuritis scores (0.3) and greater percentage of lung surface with pleuritis (1%) at slaughter (Van der Meer et al., 2016, J. Anim. Sci. 94:4704-4719). In a study with weaned piglets (4 weeks of age until 9 weeks of age), there was no difference in the incidence of veterinary treated piglets between the low and high sanitary condition (both ~4%; Van der Peet-Schwering et al., 2021, Wageningen Livestock Research, Public Report 1319). In praxis, almost 10% of the pigs at slaughter show signs of pleuritis (<https://duurzaamvarkensvlees.nl/themas/smart-farming/varkenshouder-2030/gebruik-van-data/>).

Piglets will not get bedding material in the pens. However, we expect little adverse effects because other (non-edible) pen enrichment will be present.

Explain why these effects may emerge.

The effects on health are inherent to the management model and not different from praxis.

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

In case of symptoms of respiratory distress, animals will be treated with antibiotics.

### E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

No recovery from respiratory distress. In that case, the animal will be removed from the study and transferred to standard housing if possible or humanely euthanized. An animal will also be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).

Indicate the likely incidence.

Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.

### F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

1. Ear tagging: less than mild (standard commercial procedure)
2. Group housing: less than mild
3. Housing without bedding: less than mild
4. Animal weighing: less than mild
5. Management model: mild for ~95% of the piglets in this appendix (1200 out of 1254 piglets)
6. Blood sampling: mild for ~7% of the piglets in this appendix (90 out of 1254 piglets (Exp 11 only)
7. Socializing before weaning: less than mild
8. Euthanasia after sedation (~13% of piglets): mild for ~13% of the piglets in this appendix (piglets in Exp 12-15 with a total of 14 treatments and with n=12 per treatment (as in Appendix 1) results in 168 out of 1254 piglets)
9. Imposed feeding pattern: less than mild
10. Faeces sampling: less than mild

The overall expected level of discomfort is mild for piglets under management model conditions (n=1200), for non-challenged piglets (n=30 for blood sampling in Exp 11) and piglets euthanised pre-weaning (n=24 in Exp 12 piglets).

### G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	A response in growth of an animal to a nutritional strategy cannot be determined without using animals. The physiology of a piglet, especially after weaning, and its response to suboptimal environmental conditions cannot be modelled in vitro or in silico systems. Suboptimal conditions are common in commercial husbandry, but the parameters are not controlled. In order to study the response to nutritional strategies in a reliable and repeatable way, we need controlled conditions such as those obtained with the management model.
-------------	---

Reduction	Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies and literature (see 3.1 Background in the project proposal) to decide on the treatments to be studied. The model will be validated first and a go/no go decision will follow before continuing with the other experiments (12-16). Go/no go decisions per nutritional strategy ensures that only the most promising strategies will be tested in challenge studies, allowing for the reduction in the number of animals potentially required.
Refinement	Piglets after weaning are the target animals and their physiology cannot be obtained in other species or in models. Animals will be group housed. Animals will be sedated before euthanasia. In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.). Animals will be checked daily by trained staff. Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing. The goal of the management model is to get a subclinical immune response and it is, therefore, not a disease challenge model. In case of signs of disease, animals will be treated and if needed removed from the study (Humane Endpoint).

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

#### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

#### J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.



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

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Tissue and/or digesta from the gastrointestinal tract can only be sampled after euthanasia. Only a part of the animals will be euthanised. The other animals will be kept at our own research facility or sold to a commercial fattening farm.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Overdose of barbiturate after sedation

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0800-7890789).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
3	<i>E. coli</i> challenge model

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The *E. coli* challenge model will be applied to validate the optimized nutritional strategy regarding the use of coarse raw materials in feed before and after weaning (Exp. 17). The 2 most promising nutritional strategies will be tested against a standard/control diet, resulting in a total of 3 treatments. The 2 nutritional strategies come from Exp. 5, 6 and 14 (see 3.4.1 in Project proposal) and the control will be the strategy that is currently used in praxis. The primary outcome parameter is the diarrhoea incidence after the *E. coli* challenge. Other outcome parameters are feed intake and health (to be measured as body condition, behaviour and skin condition). The *E. coli* challenge will result in an immediate drop in feed intake that typically lasts for max 7 days and an increase in diarrhoea that typically lasts max 10 days.

Piglets will be housed in groups of 3 and receive the *E. coli* inoculum using a revolver syringe to ensure each piglet receives it. Piglets will be selected based on their susceptibility towards ETEC O149:F4ac by a DNA-marker test as described in 3.1 Background of the Project proposal. In the past, we used tails for this purpose since tail docking was standard practise. However, we are already validating alternatives for the tails such as hair, oral swab (like for human DNA tests) or a piece of ear that is removed during the standard procedure of inserting the ear label needed for identification purposes. In this way, we do not need to inflict additional discomfort to the piglets for the purpose of the DNA-marker test.

Only susceptible heterozygote (RS) and susceptible homozygote (SS) animals are used in the challenge since these will show a greater response to the challenge as opposed to non-susceptible homozygote (RR) animals. This will reduce variation and, therefore, the number of animals needed. The genotype of the mother sow could also be tested but the sow is not always inseminated with semen from the same boar. Thus, the parent genotype is not suitable to select the susceptible piglets. SS piglets show the greatest response but are at

greatest risk of getting dehydrated. Therefore, RS and SS piglets will be mixed in a pen which will result in a lower response on pen level but less risk of losing piglets, and thus replicates and experimental power, during the trial.

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

Proposed animal procedures:

1. Before weaning, piglets will be individually ear-tagged and birth weights will be recorded. Creep feed will be given as free-choice. Piglets will be weaned at a minimum age of 21 days old into specialised housing which are cleaned before entering of a new group and which is separated from housings where the sows are kept (Council Directive 2008/120/EC).
2. Piglets will be housed in groups of 3 with a mix of RS and SS piglets.
3. Housing without bedding for maximally 6 weeks after weaning. This is required to properly assess the effects of the nutritional strategies. Consumption of bedding (typically coarse and fibrous materials) might interfere with the response leading to more variation and a higher number of animals required to show an effect.
4. Animal weighing every 7 days for a maximum of 10 weeks (before and after weaning periods).
5. Blood sampling. Maximal 8 times within 10 weeks before and after weaning with a maximum of 10 mL and 8ml/kg/14 days for young animals. Route: intravenous. Out of the 8 samples, a maximum of 2 blood samples will be taken before weaning (max 4 weeks time-period) in case samples before administration of creep feed and on the day before weaning (without weaning stress) are required. Before administration of creep feed, it is not always known which animals will be included in the experiment after weaning. Thus, a blood sample might be taken from an animal that is not used after weaning. Out of the 8 samples, a maximum of 6 samples will be taken after weaning (max 6 weeks time-period). Analysis: markers for gut permeability or inflammation.
6. *E. coli* challenge: oral route 1 ml pathogenic *E. coli* (O149K91K88ac) for maximal 3 consecutive days within the first two weeks post-weaning. Piglets will be minimally 28 days of age when receiving the *E. coli* inoculum. The *E. coli* inoculum will be provided using a revolver syringe.

Example of a timeline of the experiment:

Day in experiment	Procedure
Birth	Ear tag + remove piece of ear for DNA-marker test + birth weight
~10 of age	Start experimental feed + blood sample + body weight
~23 of age	Blood sample + body weight
~24 of age = day 0	Weaning into groups of 3
Day 6	Blood sample + body weight
Day 6-8	<i>E. coli</i> challenge
Day 13	Blood sample + body weight
Day 20	Blood sample + body weight
Day 27	Blood sample + body weight
Day 34	Blood sample + body weight
Day 41 (=6 weeks after weaning)	Blood sample + body weight

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

Data from studies using 3 piglets per pen were used to estimate the error variance in this specific animal facility for the period day 0-14 after weaning. This is the period where we expect most effects of the nutritional strategies and *E. coli* challenge. 500 studies are simulated in a statistical software package using relevant means ranging between 0.15 and 0.45 (i.e., 15-45% diarrhoea incidence). We aim to detect an absolute difference of 0.15 within this range of means. Previous studies with nutritional strategies have shown that we can detect this difference in our facility using this *E. coli* challenge model. The 500 simulations are, thereafter, analysed using a generalized linear mixed model (GLIMMIX) which is also the model used to analyse the data after a study is completed. The proportion of simulations showing a significant treatment effect should be >80% in order to ensure a power of 80% and a probability of 95%.

Error variance = 7.37

Means = 0.15 – 0.30 – 0.45 (relevant difference of 0.15 absolute)  
 Number of replicates (=pens) per treatment = 18

**B. The animals**

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Sus scrofa	Own facility	Pre-/weaned piglets	207	Males and females	No	Hypor Libra × Hypor Maxter

Provide justifications for these choices

Species	Sus scrofa is the target species
Origin	We have our own facility with a sow herd, where we breed our own piglets
Life stages	Piglets before and after weaning up to 6 weeks after weaning are the target group
Number	Post-weaning: 3 treatments (see A) × 18 pens × 3 animals = 162 piglets undergoing the <i>E. coli</i> challenge. Pre-weaning: 3 treatments × maximally 15 animals = maximally 45 animals undergoing blood sampling but not selected for the post-wean phase. At the start of the experiment, it is not always known which piglets will be included in the post-wean phase; for example, piglets of poor health or treated with antibiotics before weaning will be excluded but might have been used for blood sampling. 15 animals per treatment are required to find a relevant difference in e.g., plasma haptoglobin concentration (see Appendix 2).
Gender	Males and females are representative for the commercial situation
Genetic alterations	Not applicable.
Strain	This strain is present at our own facility and representative of the commercial situation

**C. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

During the pre-weaning phase of the experiment piglets will be housed in conventional farrowing crates together with the dam.

Piglets will be housed without bedding material because intake of bedding material interferes with the measurements to be made via effects on nutrient digestibility. Variations in intake of bedding material between animals will also increase variation in outcome parameters and, thus, increase the number of animals needed to show an effect. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor to provide comfortable resting places.

**D. Pain and compromised animal welfare**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Blood sampling might induce pain, but no sedation will be used. A single insertion of a needle to sample blood is not expected to cause severe pain and the duration is short.

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

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

Due to the *E. coli* infection, all piglets will experience a period of mild diarrhoea (typically lasts max 10 days). Piglets will not get bedding material in the pens. However, we expect little adverse effects because other (non-edible) pen enrichment will be present.

Explain why these effects may emerge.

This specific *E. coli* strain causes diarrhoea especially in susceptible (RS and SS) piglets. This effect is essential for answering the research question: can our nutritional interventions reduce diarrhoea incidence?

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

Before the *E. coli* inoculum is provided, piglets will be weighed and their body condition judged visually by experienced personnel. If piglets have lost more than 9% of their body weight since weaning, they will be removed from the study, moved to another department, and put on commercial feed. This is done to ensure all piglets are healthy at the start of the *E. coli* challenge.

All animals will be checked on health status twice daily in the week immediately following the *E. coli* challenge (period with highest risk). When an animal or a pen is suspected of dehydration, additional measures can be taken such as body temperature, skin pinch test, and water intake. In case animals respond with severe dehydration symptoms, electrolytes and antibiotics will be provided.

#### **E. Humane endpoints**

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

No > Continue with question F

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

Body weight loss before the *E. coli* challenge.

Dehydration after the *E. coli* challenge by visual examination, body temperature, skin pinch test, water intake. Monitoring of the recovery from dehydration after the use of electrolytes and antibiotics.

Indicate the likely incidence.

Dehydration is unlikely. In the past studies (2021-2022) involving a total of 1200 animals, we did not have to euthanize an animal because of severe dehydration and lack of recovery.

In the week following the *E. coli* challenge it is possible that an animal dies also without showing signs of dehydration. Although we increase the frequency of monitoring of the piglets after the *E. coli* challenge, it is possible that a piglet dies in that week also for reasons other than the *E. coli* challenge. In that case the cause of death, as determined by the animal health service (Royal GD, Deventer, The Netherlands), will come back as *E. coli* even if the direct cause of death is not the challenge per se. Since it is not possible to track back what the precise cause of death was, we are obliged to classify these animals as having severe discomfort. We expect that this is at maximum 3% of the animals.

In past studies, 6 out of 1200 piglets (0.5%) were removed before the *E. coli* challenge started because of too high weight loss. For these animals, severe discomfort was avoided.

An animal will be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

1. Ear tagging: less than mild (standard commercial procedure)
2. Group housing: less than mild
3. Housing without bedding: less than mild

4. Animal weighing: less than mild
5. Blood sampling: mild
6. *E. coli* challenge: moderate

The expected level of discomfort is moderate for *E. coli* challenged animals (n=157) and maximally mild for animals only used for blood sampling pre-weaning (n=45). Severe discomfort due to the *E. coli* infection will be prevented by monitoring the animals closely especially in the period immediately following the *E. coli* challenge. However, an animal can die in that period following the *E. coli* challenge. These animals will be classified as severe discomfort and we expect that this will be maximum 3% of the animals undergoing the *E. coli* challenge (n=5; 3% of 162).

### G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	<p>A response in diarrhoea incidence of an animal to a nutritional strategy cannot be determined without using animals. The physiology of a piglet, especially after weaning, cannot be modelled in in vitro or in silico systems. Organoids could be considered but organoids resemble the physiology of the state of the animal that it was made from. For example, organoids from slaughter material will resemble the physiology of the slaughtered animal and not from a weaned piglet. In order to obtain organoids from weaned piglets, piglets in this life phase need to be sacrificed. An organoid, however, is not suitable to look at the whole gastrointestinal tract, including stomach, small and large intestine, and the residing microbiota. The interaction within the gastrointestinal tract can only be studied in an animal of the appropriate age.</p> <p>Post-weaning diarrhoea and the stress around weaning occurs in all husbandry systems. Pathogens are present in all systems and stress will give room for health issues caused by these pathogens.</p>
Reduction	<p>Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies (outside this project proposal), literature (see 3.1 Background in the project proposal), and Exp 5, 6, and 14 to decide on the treatments to be studied. Only the most promising nutritional strategies, i.e., decided based on go/no go decisions, will be tested in this Appendix. This results in a reduction in the number of animals required for this Appendix.</p> <p>RS and SS animals will be used to ensure that we obtain a difference in diarrhoea incidence (=main outcome parameter). This will lower the variation and, thus, increase the power and reduce the number of animals needed to show an effect.</p>
Refinement	<p>Piglets will be housed in groups of 3. In case 1 piglet needs to be removed (Humane End Point) or dies, piglets are still with 2 in a pen. If a second piglets needs to be removed or dies, the remaining piglet will be removed from the study and housed with other piglets in a separate barn.</p> <p>In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).</p> <p>Animals will be checked twice daily by trained staff after the <i>E. coli</i> challenge at least until the trained staff member indicates that there are no further health issues observed. The animals will then be checked once daily again.</p> <p>Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing. Piglets will be weighed before the <i>E. coli</i> inoculum is given. When a piglet has lost too much body weight or is in poor health before the <i>E. coli</i> challenge, the piglet is removed from the study and transferred to a standard housing pen at the same facility.</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

X No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

#### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

#### J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

### End of experiment

#### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Animals will be kept at our own research facility or sold to a commercial fattening farm. Before transferring animals to another farm, an antibiotic treatment will be given at the end of the experiment to ensure that there is no *E. coli* from the challenge remaining.

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

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.





## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0800-7890789).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
4	Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The studies described here aim to determine the effect of dietary protein level on the requirement of amino acids in pigs from 2-weeks after weaning until the end of the nursery (~25 kg body weight). This will be determined under optimal and suboptimal sanitary conditions. With the results, we will be able to optimize diet formulations for growth, health, and reducing nitrogen emissions in urine and faeces under different practically relevant conditions.

Two protein levels in combination with 5 levels of a test amino acid will be used. An indigestible marker will be included in the diets to calculate nitrogen digestibility in faeces. A total of 10 dietary treatments will be provided to piglets from 2 weeks to 6 weeks after weaning (end of the nursery). We have chosen for this timeframe since we first want to establish requirements in a period where the piglet is not facing stressors due to weaning. Subsequently, we will investigate the requirements of younger (weaning – 2 weeks after weaning) piglets. The requirements of amino acids in this period (week 2-6 after weaning) are currently extrapolated from older pigs. We hypothesize that in this period, the requirement of different amino acids changes rapidly and, therefore, we propose to determine the amino acid requirements on a weekly basis.

With the proposed diets, we can estimate the amino acid requirements in the context of a low and high protein diet by using a breakpoint plateau model for protein deposition and plasma urea nitrogen levels. Protein deposition will be determined from nitrogen (=protein) intake and nitrogen excretion through faeces and urine. For this, feed intake needs to be determined per individual piglet and faeces and urine needs to be quantitatively and accurately collected over a 3-day period of an individual piglet. Plasma urea nitrogen levels will be determined at the end of the (3-day) nitrogen balance period by collecting a blood sample.

Plasma urea nitrogen is a measure for body protein breakdown and, therefore, is an indicator for protein utilization efficiency. Thus, the main outcome parameters are protein deposition and plasma urea nitrogen.

### Experiment 1. Optimal housing conditions

Piglets will be housed in groups of 3 after weaning until 2 weeks after weaning. Thereafter, 1 piglet per pen will be randomly allocated to one of the ten dietary treatments for the remaining 4 weeks of the experiment. The other 2 pigs of a pen (non-experimental animals) will be returned to the commercial herd (group housing) and sold to a commercial fattener after the nursery phase (~25 kg body weight). Pigs will be adapted to the experimental diet for 4 days which is then followed by a 3-day collection period of feed intake, faeces and urine. Feed intake will be restricted to 2.2× energy required for maintenance, which is based on body weight, (close to ad libitum feed intake at this age) to ensure a uniform intake of energy between piglets. This will reduce variation between piglets.

For the separate collection of faeces and urine, stoma bags will be attached to the rear end of the piglet for the collection of faeces. Urine will be collected in urine pans situated underneath the pens.

Piglets will receive the same diet throughout the experimental period. There will be 4 collection periods: ~d19-21, d26-28, d33-35, d40-42 after weaning which are all preceded by a 4-day adaptation period to adapt the piglets to the new feeding level. A blood sample will be taken on the last day of the collection period (4 blood samples per piglet).

Example of a timeline of the experiment:

Day in experiment	Procedure
~24 of age = day 0	Body weight and weaning into groups of 3
Day 7	Body weight
Day 15	Body weight and selection of animals and individual housing (removal of 2 piglets per pen: return to commercial herd)
Day 15-18	Adaptation experimental diet + feeding level
Day 19	Body weight + attachment of stoma bags for faecal collection
Day 19-21	N balance (replacing stoma bags regularly)
Day 21	Blood sample and body weight
Day 22-25	Adaptation feeding level
Day 26	Body weight + attachment of stoma bags for faecal collection
Day 26-28	N balance (replacing stoma bags regularly)
Day 28	Blood sample and body weight
Day 29-32	Adaptation feeding level
Day 33	Body weight + attachment of stoma bags for faecal collection
Day 33-35	N balance (replacing stoma bags regularly)
Day 35	Blood sample and body weight
Day 36-39	Adaptation feeding level
Day 40	Body weight + attachment of stoma bags for faecal collection
Day 40-42	N balance (replacing stoma bags regularly)
Day 42	Blood sample and body weight + end experiment return of piglets to commercial herd

### Experiment 2. Suboptimal sanitary conditions

The same procedure is followed as for experiment 1 except piglets will be housed under suboptimal sanitary conditions from weaning onwards as specified in Appendix 2. The N balance period will be minimized to 2 weeks (week 3-4 after weaning) to reduce the time that piglets are housed individually and are exposed to suboptimal sanitary conditions.

Example of a timeline of the experiment:

Day in experiment	Procedure
~24 of age = day 0	Body weight and weaning into groups of 3 under suboptimal sanitary conditions
Day 7	Body weight
Day 15	Body weight and selection of animals and individual housing (removal of 2 piglets per pen)
Day 15-18	Adaptation experimental diet + feeding level

Day 19	Body weight + attachment of stoma bags for faecal collection
Day 19-21	N balance (replacing stoma bags regularly)
Day 21	Blood sample and body weight
Day 22-25	Adaptation feeding level
Day 26	Body weight + attachment of stoma bags for faecal collection
Day 26-28	N balance (replacing stoma bags regularly)
Day 28	Blood sample and body weight + end experiment return of piglets to commercial herd

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

Proposed animal procedures:

1. Housing without bedding for the entire experiment (~6 weeks). This is required to properly assess nitrogen efficiency, since consumption of bedding material interferes with these responses.
2. Individual housing for 4 weeks (experiment 1) or 2 weeks (experiment 2) starting from 2 weeks after weaning.
3. Attachment of stoma bags for faecal collection for 4 times (experiment 1) or 2 times (experiment 2) 3 days.
4. Animal weighing at weaning and around day 7 and 14 after weaning and before and after balance period (maximally 11 times in total in 6 weeks).
5. Blood sampling: maximally 4 times within 4 weeks after weaning with a maximum 10 mL and of 8ml/kg/14 days for young animals. Route: intravenous.
6. Amino acid levels of the experimental diets may fall outside current recommendations (lower) in order to determine the optimum levels in a breakpoint analysis.
7. Management model with an average weaning age of 24 days (minimum 21 days): Factors in the management model that will be validated are e.g., reduced temperature (e.g., 2°C), increased ventilation (reduced P-band), spreading of manure, no disinfection of the unit before animals enter.
8. Feed restriction at 2.2× energy required for maintenance.

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

For nitrogen efficiency the piglet is the experimental unit. Sample size estimation for nitrogen efficiency are made for every single experiment with a power of 80% and a probability of 95%. Using a two-tailed t-test based on variation in nitrogen efficiency the sample size estimation was performed. Effect size: 5% ( $\mu=53\%$  nitrogen efficiency; SD 5.7%); number of piglets per treatment=10. Breakpoint analyses (regression) lowers the required samples size to n=8 per treatment.

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Sus Scrofa	Own facility	Piglets	160	Males and Females	No	Hypor Libra X Hypor Maxter

Provide justifications for these choices

Species	Sus Scrofa target species of interest
Origin	Own facility/produce own piglets from onside sow herd
Life stages	Grower-Finisher target life span with largest feed consumption
Number	160 (based on power analyses and number of studies and sample points) are considered experimental animals.
Gender	Males (the choice for one gender will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals because animals will be obtained from the own herd)
Genetic alterations	Not Applicable

Strain

Own facility genetics

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

X No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

Piglets will be individually housed for 2 (experiment 2) to 4 weeks (experiment 1). Piglets will have visual, tactile and olfactory contact with neighbouring pens via a hole in the wall. Individual housing is necessary to determine individual intake and excretion of nitrogen.

Piglets will be housed without bedding material because intake of bedding material interferes with the measurements to be made via effects on nutrient digestibility. Variations in intake of bedding material between animals will also increase variation in outcome parameters and, thus, increase the number of animals needed to show an effect. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor to provide comfortable resting places.

Part of the animals will be fed below currently known amino acid requirements in order to establish the optimum amino acid level. Piglets will be fed restrictedly in order to disentangle the effect of reduced feed intake from effects of the dietary treatment.

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Blood sampling might induce pain, but no sedation will be used. A single insertion of a needle to sample blood is not expected to cause severe pain and the duration is short.

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

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

The pigs will not get bedding material in the pens. However, limited adverse effects are expected because pens will contain (non-edible) enrichment materials.

Pigs will be housed individually for 2 or 4 weeks, which may affect the pig behaviour.

Piglets might experience lung problems due to increased ventilation and reduced environmental temperature. The incidence of health issues (not specific for lung problems) in earlier trials with the management model was 4% of which lung problems were 0.3%. The 4% incidence of health issues is similar to other trials where no challenge was given to the animals. In literature, animals kept under low sanitary conditions for the entire fattening period (+/- 15 weeks) had higher pleuritis scores (0.3) and greater percentage of lung surface with pleuritis (1%) at slaughter (Van der Meer et al., 2016, J. Anim. Sci. 94:4704-4719). In a study with weaned piglets (4 weeks of age until 9 weeks of age), there was no difference in the incidence of veterinary treated piglets between the low and high sanitary condition (both ~4%; Van der Peet-Schwering et al., 2021, Wageningen Livestock Research, Public Report 1319). In praxis, almost 10% of the pigs at slaughter show signs of pleuritis (<https://duurzaamvarkensvlees.nl/themas/smart-farming/varkenshouder-2030/gebruik-van-data/>).

Explain why these effects may emerge.

Pigs are social animals and like to eat, huddle, sleep and play together with pen mates.

The effects on health from suboptimal sanitary conditions are inherent to the management model and not different from praxis.

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

The time that animals will be housed individually is minimized to 2 (experiment 2) or 4 weeks (experiment 1). Furthermore, pigs are housed in pens specially designed for individual housing having an opening in the wall allowing pigs to have nose-to-nose contact with a neighbouring piglet. Floor heating below the pens, ensures the temperature in the pen is within the thermoneutral zone for piglets of a certain age. In case of symptoms of respiratory distress, animals will be treated with antibiotics.

#### E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

No recovery from respiratory distress. In that case, the animal will be removed from the study and transferred to standard housing if possible or humanely euthanized. An animal will also be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).

Indicate the likely incidence.

Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.

#### F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Proposed animal procedures:

1. Housing without bedding material: less than mild
2. Individual housing for 2 weeks (experiment 2) or 4 weeks (experiment 1): moderate
3. Attachment of stoma bags: mild
4. Weighing: less than mild
5. Blood sampling: mild
6. Amino acid levels below recommendations: mild
7. Suboptimal sanitary conditions: mild
8. Feed restriction: mild

The expected level of discomfort is moderate for all experimental animals (n=160).

#### G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	Responses of animals towards different protein and amino acid levels under optimal and specific pathogen conditions needs to be determined in the animal itself. The used dietary protein and amino acids levels will be based on literature. In silico models will be used to assure that the desired effect will be seen. The in silico model, however, is not capable of estimating the effect of a specific pathogen on requirements. The results of the in vivo experiment will be used to improve the in silico model.
Reduction	Sample size estimations are done using data from our own facility. RS and SS animals will be used to ensure that we obtain a difference in diarrhoea incidence (=main outcome parameter). This will lower the variation and, thus, increase the power and reduce the number of animals needed to show an effect.

Refinement	<p>Piglets are the target animals. Using other animals (mice, rats) as a model will not result in less discomfort to an individual. In addition, protein deposition is species specific. Therefore, the experimental treatments should be tested in the target animal directly. Pigs will receive non-edible enrichment material to reduce stress and expression of abnormal behaviour. Pigs are closely followed to check health and welfare issues during the experiments, with both being documented daily and medical treatments will be applied if necessary. Nitrogen efficiency will be measured indirectly using total collection of faeces and urine to reduce discomfort. Pigs are social animals and will be housed in groups for the first two weeks. Period and number of pigs that need to be housed individually are limited as much as possible. When housed individually nose to nose contact is still possible. Pigs are housed in pens specially designed for individual housing with floor heating ensuring the temperature is within the thermoneutral zone. Blood sampling will be performed by trained personnel.</p> <p>We will do whatever is possible to adapt piglets to human handling prior to the start of the experiment in order to refine the procedure of attaching the stoma bags.</p>
------------	---

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

**H. Re-use**

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

**I. Repetition**

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

**J. Location where the animals procedures are performed**

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

---

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Animals will be kept at our own research facility or sold to a commercial fattening farm. Before transferring animals to another farm, an antibiotic treatment will be given at the end of the experiment to ensure that there is no *E. coli* from the challenge remaining.

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

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

---

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** dinsdag 14 maart 2023 15:34  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Input voor minderheidsstandpunt

Hoi 5.1 lid2e

Afgelopen vergadering is besloten om een aanvraag te vergunnen waarbij je een minderheidsstandpunt had ingenomen over het niet vergunnen van een specifieke bijlage. Ik zou met jou nog een minderheidsstandpunt afstemmen voor in de beschikking. In je Rvo mail heb ik je een opzet gestuurd van een opmerking over jouw standpunt voor in de beschikking. Kun je me hier uiterlijk vrijdag feedback kunnen geven?

Alvast bedankt!

5.1 lid2e



---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** dinsdag 14 maart 2023 15:31  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Minderheidsstandpunt bij AVD 202316684

Hoi 5.1 lid2e

Ik zou met jou nog een minderheidsstandpunt afstemmen voor in de beschikking van AVD202316684 getiteld "Ontwikkelen van voerstrategieën die beter aansluiten bij de nutriëntbehoeftes van biggen na spenen en tevens duurzaamheid, groeiprestaties, welzijn en gezondheid bevorderen". 5.2 lid1

Daarom

heb ik een opzet gemaakt voor een opmerking in de vergunning, zie hieronder:

#### Opmerking voor in de vergunning

De projectaanvraag wordt vergund met een minderheidsstandpunt. Eén CCD-lid is van oordeel dat het testen en optimaliseren van voederstrategieën die specifiek gericht zijn op het ondersteunen van dieren in suboptimale managementcondities een houderij systeem in stand houden dat onvoldoende tegemoet komt aan maatschappelijke ontwikkelingen op het gebied van duurzaamheid en dierenwelzijn. De ethische afweging omtrent de proeven in bijlage dierproeven 3.4.3.2 valt daarom voor dit lid negatief uit.

Is hoop dat dit een beetje in lijn met jouw bezwaren. Kun jij deze opzet aanpassen/of aanvullen waar nodig?

Met het oog op de behandeltermijn zou ik de beschikking graag vrijdag 17 maart op willen maken. Is dat haalbaar voor jou?

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** vrijdag 17 maart 2023 09:40  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** RE: Minderheidsstandpunt bij AVD 202316684

**Opvolgingsvlag:** Opvolgen  
**Vlagstatus:** Voltooid

Hoi 5.1 lid2e  
5.2 lid1  
Groet en alvast goed weekend.  
5.1 lid2e

---

**Van:** 5.1 lid2e  
**Verzonden:** dinsdag 14 maart 2023 15:31  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Minderheidsstandpunt bij AVD 202316684

Hoi 5.1 lid2e

Ik zou met jou nog een minderheidsstandpunt afstemmen voor in de beschikking van AVD202316684 getiteld "Ontwikkelen van voerstrategieën die beter aansluiten bij de nutriëntbehoeftes van biggen na spenen en tevens duurzaamheid, groeiprestaties, welzijn en gezondheid bevorderen". 5.2 lid1

zie hieronder:

#### Opmerking voor in de vergunning

De projectaanvraag wordt vergund met een minderheidsstandpunt. Eén CCD-lid is van oordeel dat het testen en optimaliseren van voederstrategieën die specifiek gericht zijn op het ondersteunen van dieren in suboptimale managementcondities een houderij systeem in stand houden dat onvoldoende tegemoet komt aan maatschappelijke ontwikkelingen op het gebied van duurzaamheid en dierenwelzijn. De ethische afweging omtrent de proeven in bijlage dierproeven 3.4.3.2 valt daarom voor dit lid negatief uit.

5.2 lid1

Met het oog op de behandeltermijn zou ik de beschikking graag vrijdag 17 maart op willen maken. Is dat haalbaar voor jou?

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e



## Advies aan CCD

Datum 17 maart 2023  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202316684

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health.  
 Aanvraagnummer: AVD202316684  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	
	<p>Vragen project.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- De beslisstrategie omtrent go/no-go momenten is onvoldoende helder. In het projectvoorstel geeft u aan dat de go/no-go beslissingen gebaseerd zijn op een vooraf bepaald 'key performance indicators set', maar noemt enkel 3 voorbeelden van performance indicatoren. Kunt u de gehele set benoemen? Kunt u ook aangeven hoe deze indicatoren gewogen zullen worden in de beslissing?</li> <li>- Kunt u toelichten waarom 'Growth performance' onder 3.4.1 als typical key performance indicator wordt benoemd voor het maken van go/no-go beslissingen en op welke manier deze indicator aansluit bij de onder 3.2.1 benoemde projectdoelen?</li> <li>- Wij verzoeken u om in de bijlagen, onder C, te onderbouwen waarom bij de huisvesting van de dieren zal worden afgeweken van Richtlijn 2010/63/EU.</li> <li>- Kunt u in bijlage 3.4.3.1 ook onder C. (huisvesting en verzorging) benoemen dat een deel van de dieren voedselrestrictie zal ondergaan?</li> <li>- In het projectvoorstel staat dat zowel het E. coli challenge model als het management model (suboptimale condities) de omstandigheden op commerciële bedrijven nabootsen om voorspellingen te kunnen doen over de effectiviteit van voedingsstrategieën in de praktijk. Uit uw projectaanvraag blijkt echter niet waarom het noodzakelijk is om beide modellen hiervoor te gebruiken. Kunt u toelichten welke inzichten het challenge model toevoegt aan de inzichten die door middel van het</li> </ul>

	<p>management model verworven zullen worden en waarom deze relevant zijn voor het (beter) kunnen voorspellen van de effectiviteit van een nieuwe voedingsstrategie in de praktijk?</p> <p>- Kunt u toelichten waarom het niet mogelijk is om humane eindpunten te formuleren die in combinatie met scherpe monitoring kunnen voorkomen dat dieren komen te overlijden aan een E. coli infectie?</p> <p>Vragen NTS.</p> <p>- Kunt u voor jargonwoorden, zoals spenen, tomen en management model toelichten wat deze betekenen?</p> <p>- Kunt u toelichten wat optimale en suboptimale varkenshouderij en waarom het van belang is om voor beide varianten voeders te ontwikkelen?</p> <p>- 3% van de dieren die een e-coli challenge krijgen worden zo ziek dat ze komen te overlijden. Deze oorzaak van het ernstige ongerief wordt niet benoemd in 'adverse effects' sectie. Kunt u deze sectie aanpassen zodat het voor de lezer duidelijk is dat dit challenge model ernstige gezondheidsproblemen kan veroorzaken?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Nutrient utilization model</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen tot 6 weken na spenen	888	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.2 Management model</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen tot 6 weken na spenen	1.254	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.3 E. coli challenge model</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Biggen tot 6 weken na spenen	207	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions</b>				
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )		160	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Nutrient utilization model

Citaat.

During the pre-weaning phase of the experiment piglets will be housed in conventional farrowing crates together with the dam.

Piglets will be housed without bedding material. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor.

### 3.4.3.2 Management model

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.3 E. coli challenge model

Zie 3.4.3.1.

### 3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions

Citaat.

Piglets will be individually housed for 2 (experiment 2) to 4 weeks (experiment 1). Piglets will have visual, tactile and olfactory contact with neighbouring pens via a hole in the wall. Piglets will be housed without bedding material. Non-edible pen enrichment will be provided to allow animals to play and exhibit normal behaviour. The pen enrichment meets the requirements set by the NVWA.

The pens have a tenderfoot slatted floor.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Nutrient utilization model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### 3.4.3.2 Management model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### 3.4.3.3 E. coli challenge model

Varkens (*Sus scrofa domesticus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### 3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions

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 C8. [...] Omdat gekozen is de dieren voortaan op eigen locatie te huisvesten in plaats van gebruik te maken van bestaande varkenshouderijen, heeft men een validatiestudie opgenomen die goed is toegelicht.</p> <p>Citaat C10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Tijdens de fase voorafgaand aan het spenen zijn de biggen samen met de zeug ondergebracht in conventionele kraamhokken. De biggen worden gehuisvest zonder strooiselmateriaal. Er zal wel niet-eetbare kooiverrijking zijn om de dieren in staat te stellen te spelen en normaal gedrag te vertonen. De kooiverrijking voldoet aan de eisen die de NVWA stelt. De kooien hebben een zachte tenderfoot bodem.</p> <p>Citaat C20. Hergebruik voor andere experimenten is niet overwogen omdat de biggen na afloop naar varkenshouderijen gaan: herplaatsing.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat.</p> <p>1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk om voedingsstrategieën te ontwikkelen die beter aan de eisen voldoen van biggen voor, rond en na het spenen in optimaal en suboptimale (inclusief pathogene druk) omstandigheden met als uiteindelijke doel een bijdrage te leveren aan de verduurzaming van de varkenshouderij door antibioticagebruik en sterfte van jonge biggen te verminderen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.</p> <p>2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de 2187 proefdieren plaats, met mild ongerief, voor 322 dieren kan maximaal matig ongerief optreden. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen, dat meer kennis wordt verkregen over de ontwikkeling van maag/darmstelsel van jonge biggen en de invloed van voeder/nutriënten rondom de speenleeftijd. Ook zal met verbeterde voedingsstrategieën een duurzamer houderijsysteem kunnen worden ontwikkeld. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de instelling van belang kan zijn om daarmee</p>
-------------------	---

commerciële voeders te ontwikkelen is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar geen gewicht aan toe. Omdat de aanvrager heeft besloten eigen stallen te ontwikkelen om het onderzoek 'in huis' te kunnen uitvoeren, is een eenmalige validatie studie noodzakelijk. De DEC heeft dit meegenomen in haar afweging.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het doel om voedingsstrategieën te ontwikkelen die beter aan de eisen voldoen van biggen voor, rond en na het spenen in optimaal en suboptimale (inclusief pathogene druk) omstandigheden met als uiteindelijke doel een bijdrage te leveren aan de verduurzaming van de varkenshouderij door antibioticagebruik en sterfte van jonge biggen te verminderen een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt, dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
<p>Het DEC advies is niet geheel helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld en bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere uiteenzetting. Bij C10 hadden wij echter graag ook een oordeel teruggezien over de onderbouwing voor afwijkende huisvesting van de dieren.</p> <p>De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen, maar gaat voorbij aan het ernstige ongerief dat de dieren in bijlage 3 zullen ondergaan. Ook hadden wij graag gezien dat het ernstige ongerief inhoudelijk was beoordeeld onder C11. In verband met dit ernstige ongerief is de beoordeling achteraf onder E1. een vereiste voorwaarde.</p> <p>Het project richt zich op voeding voor biggen in de veehouderij. Daarmee speelt het ethische dilemma rondom de veehouderij ook bij dit project. Dit hadden wij graag in het advies teruggezien.</p>

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat.</p> <p>The ultimate goal of this project is to develop nutritional strategies that will better meet the requirements of piglets before, around, and after weaning in optimal and sub-optimal (including pathogenic pressure) environments. With these nutritional strategies, we aim to increase the sustainability of pig production by helping to reduce mortality rate and the use of antibiotics, by using raw materials that meet animal requirements, by supporting feed intake and gastrointestinal tract development around weaning, and by improving animal welfare for example by reducing abnormal behaviour (tail, biting, belly nosing).</p> <p>The immediate goals are:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. To validate a management model that simulates commercial conditions but in a controlled environment (Appendix 2).</li><li>2. To determine the optimal lysine to energy ratio and energy level in piglets after weaning (Appendix 1).</li><li>3. To determine the effect of creep feed, fatty acid level and fatty acid composition on fat digestibility, bile acid production, enzyme secretion, gastrointestinal development, and blood lipid metabolite profile after weaning (Appendix 1). Socializing the piglets before weaning might be used as model to reduce weaning stress and, thus, to disentangle the effect of stress from feed transition (sow milk to solid feed) from social stress (mixing of piglets) on fat digestibility. The optimal fatty acid level and fatty acid composition will also be determined under suboptimal</li></ol>
-------------------------------------	---



sanitary conditions (Appendix 2) in order to translate the knowledge into practical conditions.

4. To determine the optimal ratio between unsaturated and saturated (U:S ratio) fatty acids on fat digestibility under optimal (Appendix 1) and suboptimal sanitary conditions (Appendix 2).

5. To determine the interaction between dietary protein level and specific amino acids requirements under optimal and suboptimal sanitary conditions. Nitrogen balance experiments will be done to determine protein deposition under optimal and suboptimal sanitary conditions (Appendix 4). The optimal protein and amino acid levels will be verified in a growth performance trial under optimal (no animal experiment) and suboptimal sanitary conditions (Appendix 2).

6. To determine the interaction between feed particle size and the optimal inclusion level of coarse raw materials in the diet given before and after weaning on stomach and intestinal development and nutrient digestibility after weaning under optimal (Appendix 1), suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) and a specific pathogen challenge (E. coli challenge model; Appendix 3).

7. To determine the effect of feed form (mash, pellet, crumble, extruded feed) and transition between feed forms at weaning on gastrointestinal development and health (Appendix 1).

8. To determine the optimal buffering capacity in diets for piglets after weaning under suboptimal sanitary conditions (Appendix 2) conditions. Optimal levels under optimal conditions were already established in an in-house study.

9. To determine the interactive effect between buffering capacity and feed particle size distribution on gastrointestinal development and health (Appendix 1).

Next to the response parameters specified in the appendices, we will also evaluate sustainability metrics when applicable. The metrics are divided in diet-related and animal-related metrics. Diet-related: resource (use of fossil fuel) and water use, environmental acidification, nitrogen and phosphorus excretion during pig production, CO<sub>2</sub> emission from transport of raw materials or from raw material production itself. Animal-related: behaviour scores, body condition scores, mortality, and morbidity.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>The scientific relevance of the immediate goals is to better understand the piglet's requirements around weaning which is one of the most stressful events in a pig's life. The lack of understanding of the physical state and the variable response to weaning of the post-weaning piglet makes it challenging for nutritionists to establish an optimal diet. However, there are certain aspects that are similar between piglets: they all need energy to survive, nutrients to develop their gastrointestinal tract, and need adequate nutrition to combat pathogens and stay healthy. Moreover, changes in legislation, e.g., the expected ban on tail docking and use of in-feed antibiotics and pharmacological levels of zinc oxide, stress the need to understand the nutritional requirements of piglets in this phase, also to prevent damaging behaviours. Nutrient requirements for weaned piglets are mostly extrapolated from older pigs and we have just started to unravel the complex physiology of a piglet around weaning and its accompanying nutrient requirements. Results from the immediate project goals will be used to further optimize piglet feeding strategies internally but our results will also be published in scientific journals. Regarding the social relevance of the ultimate goal, main aspects are to further reduce reliance on antibiotics for pigs in order to maintain future availability of antibiotics for human medicine. Secondly, this project will contribute to the use of non-human-edible feed ingredients (e.g., co-products from food production) for feed, leaving human-edible ingredients available as food.</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.</p> <p>De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De instelling is een internationaal diervoedingsbedrijf dat voedingsadditieven en voedingsstrategieën ontwikkelt voor de meeste diersoorten. Het bedrijf heeft de ambitie om een wereldleider te zijn op dit gebied en focussed duurzame veehouderij, zoals het verminderen van antibioticagebruik, het verbeteren van de gezondheid en het welzijn van dieren en het verminderen van de milieubelasting van de veehouderij door bijvoorbeeld het verminderen van nutriëntenverliezen in urine en uitwerpselen en het verminderen van emissies in verband met de productie. Het bedrijf wil kennis vergaren over de afgifte van voedingsstoffen in de darm en een betere vertering en gebruik van grondstoffen met een lagere beschikbaarheid/ verteerbaarheid van voedingsstoffen. Het bedrijf heeft een speciale R&amp;D-afdeling met onderzoeksteams voor alle soorten in omvang, inclusief varkens. Elk soortenteam heeft ongeveer 6 onderzoekswetenschappers die een doctoraat hebben met betrekking tot dier- of diergeneeskunde en ze onderhouden een breed internationaal wetenschappelijk netwerk. De studies zullen worden uitgevoerd in het eigen onderzoekscentrum in Nederland, waar is geïnvesteerd in een state-of-the-art unit en waar proeven kunnen worden uitgevoerd die specifieke omgevingscondities nabootsen en beheersen. Hoge bioveiligheids- en hygiënenormen worden gehandhaafd om personeel en dieren te beschermen. Dagelijkse verzorging van dieren, metingen en experimentele technieken worden uitgevoerd door gecertificeerd competent en ervaren personeel. Projectresultaten zullen worden verspreid via wetenschappelijke tijdschriften en conferenties en uiteindelijk worden vertaald in voedingsstrategieën, die worden toegepast via het wereldwijde netwerk van voedingsdeskundigen.</p> <p>5.2 lid 1</p>
---	--

**3V's**

Vervanging

	<p><b>3.4.3.1 Nutrient utilization model:</b> Citaat.</p> <p>We have an in-house in vitro digestion kinetics model in which we can screen raw materials and diets. Wherever possible, first a screening with this model will be done in order to select the raw materials and diets to be tested in in vivo studies. Interactions between raw materials and /or nutrients on e.g., digestibility and nutrient utilization, passage through the gastrointestinal tract, and acidification in the stomach cannot be studied outside animals. Especially not in a weaned piglet where digestive physiology changes rapidly due to weaning. Animal data is also needed to validate the in vitro digestion kinetics model.</p> <p>Faecal samples could be obtained non-invasively but are not representative for what is happening in different parts of the gastrointestinal tract. For this project, the stomach and small intestine are the most important parts of the gastrointestinal tract.</p> <p>Changes in digestive physiology and the stress around weaning occurs in all husbandry systems.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Management model:</b> Citaat.</p> <p>A response in growth of an animal to a nutritional strategy cannot be determined without using animals. The physiology of a piglet, especially after weaning, and its response to suboptimal environmental conditions cannot be modelled in in vitro or in silico systems. Suboptimal conditions are common in commercial husbandry, but the parameters are not controlled. In order to study the response to nutritional strategies in a reliable and repeatable way, we need controlled conditions such as those obtained with the management model.</p>
	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.</p> <p>A response in diarrhoea incidence of an animal to a nutritional strategy cannot be determined without using animals. The physiology of a piglet, especially after weaning, cannot be modelled in in vitro or in silico systems. Organoids could be considered but organoids resemble the physiology of the state of the animal that it was made from. For example, organoids from slaughter material will resemble the physiology of the slaughtered animal and not from a weaned piglet. In order to obtain organoids from weaned piglets, piglets in this life phase need to be sacrificed. An organoid, however, is not suitable to look at the whole gastrointestinal tract, including stomach, small and large intestine, and the residing microbiota. The interaction within the gastrointestinal tract can only be studied in an animal of the appropriate age.</p> <p>Post-weaning diarrhoea and the stress around weaning occurs in all husbandry systems. Pathogens are present in all systems and stress will give room for health issues caused by these pathogens</p>

**3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:**

Citaat.

Responses of animals towards different protein and amino acid levels under optimal and specific pathogen conditions needs to be determined in the animal itself. The used dietary protein and amino acids levels will be based on literature. In silico models will be used to assure that the desired effect will be seen. The in silico model, however, is not capable of estimating the effect of a specific pathogen on requirements. The results of the in vivo experiment will be used to improve the in silico model.

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Nutrient utilization model:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies and literature data (see 3.1 Background in the project proposal) to decide on the treatments to be studied. Go/no go decisions per nutritional strategy ensures that only the most promising strategies will be tested in follow-up studies, allowing for the reduction in the number of animals potentially required.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Management model:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies and literature (see 3.1 Background in the project proposal) to decide on the treatments to be studied. The model will be validated first and a go/no go decision will follow before continuing with the other experiments (12-16). Go/no go decisions per nutritional strategy ensures that only the most promising strategies will be tested in challenge studies, allowing for the reduction in the number of animals potentially required.</p>
	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. Per nutritional strategy, we use previous studies (outside this project proposal), literature (see 3.1 Background in the project proposal), and Exp 5, 6, and 14 to decide on the treatments to be studied. Only the most promising nutritional strategies, i.e., decided based on go/no go decisions, will be tested in this Appendix. This results in a reduction in the number of animals required for this Appendix.  RS and SS animals will be used to ensure that we obtain a difference in diarrhoea incidence (=main outcome parameter). This will lower the variation and, thus, increase the power and reduce the number of animals needed to show an effect.</p>
	<p><b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:</b> Citaat.  Sample size estimations are done using data from our own facility. RS and SS animals will be used to ensure that we obtain a difference in diarrhoea incidence (=main outcome parameter). This will lower the variation and, thus, increase the power and reduce the number of animals needed to show an effect.</p>
Verfijnen	

	<p><b>3.4.3.1 Nutrient utilization model:</b> Citaat.  Piglets after weaning are the target animals and their physiology cannot be obtained in other species or in models.  Animals will be sedated before euthanasia.  In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).  Additional health checks will be done for experiment 2 when for the treatment where feed intake is restricted.  Standard operating procedures will be used for faeces collection to reduce variation between studies.</p>
	<p><b>3.4.3.2 Management model:</b> Citaat.  Piglets after weaning are the target animals and their physiology cannot be obtained in other species or in models.  Animals will be group housed.  Animals will be sedated before euthanasia.  In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).  Animals will be checked daily by trained staff. Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing.  The goal of the management model is to get a subclinical immune response and it is, therefore, not a disease challenge model. In case of signs of disease, animals will be treated and if needed removed from the study (Humane Endpoint).</p>

	<p><b>3.4.3.3 E. coli challenge model:</b> Citaat.</p> <p>Piglets will be housed in groups of 3. In case 1 piglet needs to be removed (Humane End Point) or dies, piglets are still with 2 in a pen. If a second piglets needs to be removed or dies, the remaining piglet will be removed from the study and housed with other piglets in a separate barn.</p> <p>In the absence of bedding, extra care will be taken that piglets have access to enrichment material at all times. The enrichment material should be manipulated, is chewable, interesting for a longer time and available for all animals in a pen (e.g., chains reaching the floor, rope, plastic toys, etc.).</p> <p>Animals will be checked twice daily by trained staff after the E. coli challenge at least until the trained staff member indicates that there are no further health issues observed. The animals will then be checked once daily again.</p> <p>Water and feed intake will be monitored daily at least for the first 14 days after weaning to get an indication of wellbeing. Piglets will be weighed before the E. coli inoculum is given. When a piglet has lost too much body weight or is in poor health before the E. coli challenge, the piglet is removed from the study and transferred to a standard housing pen at the same facility.</p>
	<p><b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions:</b> Citaat.</p> <p>Piglets are the target animals. Using other animals (mice, rats) as a model will not result in less discomfort to an individual. In addition, protein deposition is species specific. Therefore, the experimental treatments should be tested in the target animal directly. Pigs will receive non-edible enrichment material to reduce stress and expression of abnormal behaviour. Pigs are closely followed to check health and welfare issues during the experiments, with both being documented daily and medical treatments will be applied if necessary. Nitrogen efficiency will be measured indirectly using total collection of faeces and urine to reduce discomfort. Pigs are social animals and will be housed in groups for the first two weeks. Period and number of pigs that need to be housed individually are limited as much as possible. When housed individually nose to nose contact is still possible. Pigs are housed in pens specially designed for individual housing with floor heating ensuring the temperature is within the thermoneutral zone. Blood sampling will be performed by trained personnel.</p> <p>We will do whatever is possible to adapt piglets to human handling prior to the start of the experiment in order to refine the procedure of attaching the stoma bags.</p>



<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Nutrient utilization model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Management model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.3 E. coli challenge model	Nee	
3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions	Nee	

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Nutrient utilization model</b>	HEP: Worden niet verwacht	
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
<b>3.4.3.2 Management model</b>	HEP: Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.	Citaat. No recovery from respiratory distress. In that case, the animal will be removed from the study and transferred to standard housing if possible or humanely euthanized. An animal will also be removed from the study when it ends up alone in a pen (penmates removed from the study because of health reasons or death).
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Licht	
<b>3.4.3.3 E. coli challenge model</b>	HEP: 3%	Citaat. Body weight loss before the E. coli challenge. Dehydration after the E. coli challenge by visual examination, body temperature, skin pinch test, water intake. Monitoring of the recovery from dehydration after the use of electrolytes and antibiotics.
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 2,4% Ernstig 75,8% Matig 21,7% Licht	
<b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions</b>	HEP: Unlikely. Literature and previous in-house trials, indicate that the management model gives similar subclinical health issues as seen in other trials.	Zie 3.4.3.2.
Varkens ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

5.2 lid1

5.2 lid1

De aanvrager is verzocht om de criteria te concretiseren.

Van de E. coli geïnfecteerde dieren in bijlage 3 zal naar verwachting 3% (5 dieren) overlijden en ernstig ongerief ondergaan. 5.2 lid1

De aanvrager is verzocht om de HEP's op dit punt verder toe te lichten en uit te leggen waarom ernstig ongerief niet kan worden voorkomen. Indien ernstig ongerief niet uitgesloten kan worden dient de voorwaarde van een beoordeling achteraf aan het project te worden verbonden.

De dieren krijgen geen strooisel zullen dus niet volgens de Richtlijn worden gehuisvest. Hiervoor wordt geen onderbouwing gegeven onder C, maar wel onder A. Dit wordt gedaan omdat inname van strooisel de resultaten kunnen beïnvloeden. Ook worden de dieren in bijlage 4 voor 2 tot 4 weken individueel gehuisvest, om voedselinname te kunnen bepalen en urine en feces te verzamelen. 5.2 lid1

De aanvrager geeft in het projectvoorstel aan dat zowel het E. coli challenge model als het managementmodel (suboptimale condities) lijken op de omstandigheden op commerciële bedrijven. Beide modellen worden gebruikt om voorspellingen te doen of een voedingsstrategie in de praktijk effectief zal zijn. De meerwaarde van inzichten uit het challenge model, ten opzichte van het management model, worden echter niet toegelicht. Het management model kijkt echter naar effecten van subklinische infecties en geeft maximaal licht ongerief, terwijl het challenge model bij een aantal dieren tot de dood (ernstig ongerief) kan leiden. 5.2 lid1

Het project richt zich op voeding voor jonge biggen 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 onder andere op het verbeteren van voedingsstrategieën die mede kunnen leiden tot een toename van de gezondheid en het welzijn van biggen rond speenleeftijd.

Voor de dieren is er sprake van licht tot ernstig (n=5) ongerief. De mogelijke opbrengsten van het project omvatten kennis over de ontwikkeling van maag/darmstelsel van jonge biggen en de invloed van voeder/nutriënten rondom de speenleeftijd, kennis, gezondheidsaspecten (en daarmee ook productie), welzijnsaspecten en mogelijk ook duurzaamheidsaspecten met betrekking tot het milieu. **5.2 lid 1**

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

**5.2 lid 1**

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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**

Naam van het project	Ontwikkelen van voerstrategieën die beter aansluiten bij de nutriëntbehoefes van biggen na spenen en tevens duurzaamheid, groei-prestaties, welzijn en gezondheid bevorderen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-710675 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202316684
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Biggen Speenproblematiek Darmgezondheid Nutriëntbehoefte
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Gastro-intestinaal stelsel met inbegrip van de lever Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Dierenwelzijn

## 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).	<p>Het speenproces, d.w.z. het weghalen van biggen bij de zeug, is een stressvolle periode in het leven van biggen. Bij spenen worden biggen uit verschillende tomen (d.w.z. geboren bij verschillende moeders) gemixt, verplaatst naar een andere stal met bijhorende andere omgevingsbacteriën, en schakelen ze over van zeugenmelk naar minder goed verteerbaar vast voer. Dit gaat gepaard met een vermindering in voeropname wat zorgt voor een verminderde functie van de darmwand. Hierdoor kunnen ziekteverwekkende bacteriën zich vestigen in de darm wat speendiarree veroorzaakt. Daarnaast is een gezonde start de basis voor een gezond leven.</p> <p>Speendiarree kan worden behandeld met antibiotica, maar ter voorkoming van antibioticaresistentie bij bacteriën moet er worden gezocht naar alternatieven zoals bijvoorbeeld via de voeding. Het bijvoeren van biggen voor spenen heeft verschillende voordelen zoals: (1) het verteringstelsel en de darmbacteriën kunnen aangepast worden aan vast voer, (2) voeropname na spenen wordt bevorderd en (3) het risico op speendiarree wordt verminderd. Er is echter nog veel onduidelijk over wat de beste samenstelling van dit voer is en hoe deze bijvoeding het beste kan aansluiten op de voeding ná het spenen om verteringsstoornissen te voorkomen. De huidige formulering van speenvoer is voornamelijk gebaseerd op gegevens verkregen bij oudere varkens. De fysiologische uitdagingen van het speenproces zijn anders dan de fysiologische omstandigheden van oudere varkens. Er is veel onderzoek gedaan naar nutriëntbehoefes van biggen na spenen. Er blijven echter nog steeds vragen over de meest optimale voeding vooral in relatie tot het gebruik van duurzame/circulaire grondstoffen en het reduceren van de (stikstof) uitscheiding. Daarom zijn de directe doelen van dit project gericht op het ontwikkelen van voerstrategieën die beter aansluiten bij de nutriëntbehoefes van biggen voor, tijdens en na het spenen onder zowel optimale als suboptimale varkenshouderij omstandigheden. Met optimale omstandigheden wordt bedoeld een optimaal stalmanagement, stalklimaat en weinig ziektedruk. Met suboptimale omstandigheden wordt bedoeld dat het stalmanagement, stalklimaat en ziektedruk leidt tot subklinische ziekteverschijnselen bij biggen. Binnen dit project wordt gekeken naar energiegehalte, eiwitgehalte en aminozuursamenstelling, alsmede het bevorderen van de maagfunctie om daarmee gezondheid van biggen te verhogen en speendiarree en sterfte rond spenen te verminderen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit	De belangrijkste potentiële voordelen van het project is dat wij voeders kunnen ontwikkelen die beter voldoen aan de nutriëntbehoefes van biggen voor, tijdens en na spenen door middel van

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).

het beter begrijpen wat de behoeftes onder optimale en suboptimale varkenshouderij omstandigheden zijn. Met deze kennis kan vervolgens de vertaalslag naar praktijkomstandigheden gemaakt worden. Het ultieme doel van het project is het verhogen van de duurzaamheid van de varkenshouderij door het verlagen van de sterfte bij biggen, vermindering van het antibiotica gebruik, en door grondstoffen in het voer te verwerken zodat aan de behoeftes van de big wordt voldaan en de ontwikkeling van het maagdstelsel geholpen wordt. Uiteindelijk zal hierdoor ook het welzijn van de biggen verhoogd worden.

In dit project zal ook inzicht verkregen worden in de werking en ontwikkeling van de maag welke tot nu toe weinig aandacht in de wetenschap heeft gekregen, maar wel een belangrijke rol speelt bij het bevorderen van de gezondheid van de big, meer specifiek het maagdstelsel. Alleen de voerstrategieën die geen negatieve effecten laten zien onder gecontroleerde proefomstandigheden op groeiprestatie, duurzaamheid, dierwelzijn en darmgezondheid zullen verder getoetst worden onder suboptimale varkenshouderij omstandigheden. Hiermee wordt bedoeld het nabootsen van praktijkomstandigheden op het proefbedrijf door middel van bijvoorbeeld het aanpassen van de hygiënestatus tijdens de proeven.

Door te kijken naar de nutriëntensamenstelling van het voer in plaats van de grondstoffen zelf, kan ook gewerkt worden naar alternatieve voersamenstellingen waarin duurzamere/circulaire en eventueel goedkopere grondstoffen verwerkt kunnen worden zonder negatieve effecten voor de gezondheid en groeiprestaties van het dier.

## 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>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Voor het spenen worden biggen gewogen en krijgen ze een oornummer. Vast voer wordt verstrekt gedurende de dag. In bepaalde studies worden biggen voor spenen gesocialiseerd door biggen van verschillende tomen samen te voegen als model voor verminderde stress na spenen.</li><li>2. Biggen worden in groepen of individueel gehuisvest afhankelijk van de onderzoeksvraag. Individuele huisvesting zal maximaal 4 weken achtereen plaatsvinden en een big kan in de periode nog steeds andere biggen zien, besnuffelen, horen en ruiken.</li><li>3. Biggen worden gehuisvest zonder bodemmateriaal voor maximaal 6 weken na spenen. Consumptie van dit materiaal kan de meting van vertering en nutriëntbenutting beïnvloeden. Biggen krijgen wel ander verrijkmateriaal aangereikt om aan hun exploratie- en spelgedrag tegemoet te komen.</li><li>4. Biggen worden meerdere malen voor en na spenen gewogen.</li><li>5. Een managementmodel waarbij een suboptimale hygiënestatus wordt nagebootst. Factoren in het managementmodel zijn bijvoorbeeld de verlaging van de staltemperatuur, verhoging van de ventilatieluchtsnelheid, verspreiden van mest, en het niet desinfecteren van de ruimte.</li><li>6. Bloedafname uit de halsader voor maximaal 6 keer in 6 weken.</li><li>7. Verzamelen van mestmonsters via het stimuleren van het rectum voor maximaal 7 keer in de totale experimentele periode van 10 weken waarvan maximaal 2 keer voor spenen en maximaal 5 keer na spenen.</li><li>8. Verzamelen van urine door het opvangen van urine in bakken onder de hokken. Om besmetting van urine met mest te voorkomen zullen er stomazakjes bevestigd worden rond de anus zodat mest apart van de urine verzameld kan worden. De stomazakjes zullen maximaal 4 keer in 4 weken worden aangebracht en zullen maximaal 3 keer 24 uur blijven zitten.</li><li>9. Biggen worden gedood na verdoving om monsters uit het maagdarmkanaal te verzamelen of om weefsels te verzamelen. Biggen kunnen een voerpatroon opgelegd krijgen zodat er een continue stroom van nutriënten door de darm komt en er voldoende darminhoud aanwezig is. Biggen kunnen ook beperkt, echter wel boven onderhoudsbehoefte, gevoerd worden om de variatie in voeropname en daardoor variatie in de resultaten te verminderen.</li><li>10. Bepaalde nutriëntgehalten in het voer kunnen afwijken van de huidige aanbevelingen zodat preciezer de behoefte ervan kan worden vastgesteld.</li><li>11. Orale toediening van de E. colibacterie voor maximaal 3 dagen op rij in 5 weken door middel van een spuit in de mondholte.</li></ol>
<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>Biggen worden gehuisvest zonder bodemmateriaal, zoals stro of zaagsel, omdat consumptie van dit materiaal de meetresultaten kan beïnvloeden en daarmee de variatie verhogen. De hokken worden uitgerust met niet eetbare hokverrijking die voldoet aan de eisen voor wat betreft manipuleerbaarheid, kauwbaarheid, interessant voor een langere periode en beschikbaar voor alle dieren in een hok. Hiermee wordt het vertonen van spel- en exploratiegedrag mogelijk en eventuele negatieve effecten van de afwezigheid van bodemmateriaal voorkomen.</p> <p>In bepaalde experimenten worden biggen individueel gehuisvest in hokken die speciaal zijn ontworpen voor individuele huisvesting, maar hebben dan wel de mogelijkheid tot het zien, aanraken/besnuffelen, ruiken en horen van naburige biggen. De hokken staan op hoogte en er is vloerverwarming aanwezig onder de hokken zodat de temperatuur in het hok binnen de thermo-neutrale zone voor biggen ligt.</p> <p>In sommige experimenten krijgen de biggen beperkt toegang tot voer of bevat het voer een lager gehalte aan een bepaald nutriënt. Het eerste is nodig om de invloed van de voerstrategie los te kunnen koppelen van de invloed van voeropname. Het tweede is nodig om de behoeftes aan bepaalde nutriënten goed in te kunnen schatten.</p> <p>Het managementmodel levert mogelijk respiratieproblemen op maar de incidentie is naar verwachting laag (0.3% van de biggen in voorgaande proeven).</p> <p>Het toedienen van de E. colibacterie zal diarree veroorzaken die na een aantal dagen afneemt. De gezondheid van de biggen zal scherp gemonitord worden en waar nodig zullen biggen behandeld worden (bijvoorbeeld door het verstrekken van elektrolyten) om verdere negatieve effecten op diergezondheid te voorkomen. Een deel van de dieren kan komen te overlijden in de periode na het toedienen van de E. colibacterie. Deze dieren zullen als ernstig ongerief geregistreerd worden, maar zijn niet noodzakelijk als direct gevolg van de E. colibacterie overleden.</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)?	<i>Soort:</i>	<i>Totaal aantal</i>	<i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i>			
			<i>Terminaal</i>	<i>Licht</i>	<i>Matig</i>	<i>Ernstig</i>
Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )		2509	0	2187	317	5
Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?	<i>Soort:</i>	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>				
		<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>		
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )		0	1801	0	
Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.	<p>Dieren worden gedood als het voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag nodig is om monsters van de darminhoud te nemen.</p> <p>Wanneer het doden niet nodig is, zullen biggen grootgebracht worden op een commerciële varkenshouderij of op de eigen proeffaciliteit.</p>					



## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Verteringsprocessen in biggen kunnen deels in vitro nagebootst worden. Het in vitro verteringsmodel zal worden toegepast waar mogelijk om grondstoffen en voeders te bestuderen voordat deze worden toegepast in dierexperimenten. Echter, interacties tussen voeders en het maagdarmkanaal, bv vertering, absorptie, nutriëntenpassage door de darm en aanzuring in de maag, kunnen niet bestudeerd worden zonder gebruikt te maken van doeldieren. Met name de fysiologie van de gespeende big is complex en moeilijk na te bootsen buiten het dier. Verteringsgegevens van biggen zijn ook nodig om het in vitro verteringsmodel te valideren zodat deze verbeterd wordt voor toekomstig gebruik.</p> <p>Mest- en urinemonsters kunnen zonder ongerief voor het dier genomen worden. Echter deze zijn niet representatief voor wat er in de verschillende segmenten van het maagdarmkanaal, zoals de maag en de dunne darm, plaatsvindt.</p> <p>De toedienen van E. coli en het managementmodel zouden op commerciële bedrijven getest kunnen worden. Echter daar zijn de houderij omstandigheden variabel en tamelijk onvoorspelbaarder waardoor een hoger dieraantal nodig is vanwege een grotere variatie in de meetresultaten. Lichaamsgroei als gevolg van een voerstrategie is moeilijk middels computermodellen te simuleren omdat deze afhankelijk is van verschillende factoren vooral bij gespeende biggen gehouden onder verschillende huisvestingsomstandigheden.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> 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.</p>	<p>Het aantal dieren wat gebruikt wordt per experiment wordt geminimaliseerd zoals is bepaald door middel van statistische powerberekeningen. De variatie gebruikt voor deze berekeningen is gebaseerd op eerdere soortgelijke proeven in dezelfde proeffaciliteit. Voor elk experiment zal een nieuwe power berekening gedaan worden op basis van de meest recente resultaten. Voor elke voerstrategie zal voorafgaand aan een experiment eerst de al gedane studies en literatuur bestudeerd worden en eventueel in vitro onderzoek gedaan worden om zo de meest veelbelovende strategieën te kiezen. Go/no go beslissingen worden op basis van vastgestelde criteria (dat wil zeggen groeiprestatie, dierwelzijn en gezondheid) gemaakt voordat vervolgstudies worden opgezet. Het managementmodel zal eerst gevalideerd worden voordat vervolgstudies ingezet worden. Biggen in het E. coli model zullen geselecteerd worden op genotype en alleen de genotypen die hoog gevoelig zijn voor de specifieke E. coli zullen gebruikt worden. Dit vermindert de variatie in de resultaten waardoor uiteindelijk minder biggen nodig zijn.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> 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.</p>	<p>Biggen zijn de doeldieren en hun fysiologie kan niet vergeleken worden met die van andere diersoorten of bestudeerd worden met behulp van computermodellen.</p> <p>Dieren worden waar mogelijk in groepen gehuisvest. Als individuele huisvesting noodzakelijk is, zal de periode zo kort mogelijk worden gehouden. Neus-neus contact met naburige biggen is altijd mogelijk.</p> <p>Biggen worden altijd verdoofd voor het doden.</p> <p>Biggen krijgen geen bodemmateriaal in hun hok, maar krijgen wel te allen tijde andere verrijkmateriaal. Dit verrijkmateriaal moet, om aan de ethologische behoeften tegemoet te komen, manipuleerbaar en kauwbaar zijn en interessant voor een langere periode. Voorbeelden zijn kettingen die over de grond gaan, touw, plastic speeltjes, enz.</p> <p>De gezondheid van de biggen zal dagelijks worden gecontroleerd door gecertificeerd en getraind deskundig personeel. Na het toedienen van de E. colibacterie en in het geval van het managementmodel zullen de biggen vaker gecontroleerd worden zodat kan worden ingegrepen voordat de gezondheid van de biggen het humaan eindpunt bereikt. Hiervoor zal ook de water- en voeropname dagelijks gecontroleerd worden tenminste voor de eerste 2 weken na spenen aangezien dit ook een maat is voor welzijn. Biggen die gewicht zijn verloren voordat de E.</p>

colibacterie toegediend wordt, worden uit de proef gehaald en overgebracht naar een standaardhok op dezelfde proef Faciliteit om te herstellen. Deze biggen krijgen dus geen E. colibacterie toegediend. Biggen in het E. coli model zullen geselecteerd worden op genotype en alleen de genotypen die hoog gevoelig zijn voor de specifieke E. coli zullen gebruikt worden. Dit zorgt voor verfijning aangezien de minder gevoelige dieren niet onnodig blootgesteld worden aan de bacterie. Standaardprocedures voor het verzamelen van mest en urine zullen gebruikt worden om variatie tussen proeven te verminderen. Voor het aanbrenge van stomazakjes rond de anus om mest te verzamelen moeten de biggen gehanteerd worden. Hiervoor zullen biggen vooraf worden gewend aan het hanteren door mensen.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Het speenproces bij het doeldier (varken) is uniek en kan moeilijk gesimuleerd of bestudeerd worden bij andere diersoorten. Voor de experimenten in dit project wordt de doelgroep van biggen tot 6 weken na spenen gebruikt omdat oudere varkens niet representatief zijn.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-05-2029
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
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	



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD **202316684**  
Bijlagen  
3

Datum 20 maart 2023  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **5.1 lid2a**,

Op 6 januari 2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health." met aanvraagnummer AVD **202316684**. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 juni 2023 tot en met 31 mei 2028.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

#### **Beoordeling achteraf**

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

## Procedure

**Datum:**  
20 maart 2023  
**Aanvraagnummer:**  
AVD ~~5.1 lid2h~~ 202316684

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de **5.1 lid2h** (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 15 februari 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 3 maart 2023 en 14 maart 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de beslisstrategie omtrent go/no-go momenten, uitkomstparameters, huisvesting, voedselrestrictie, gekozen modellen, de humane eindpunten en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Omdat in het E. coli challenge model ernstig ongerief kan optreden is de voorwaarde van een beoordeling achteraf vereist.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2029 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

### *Aanvullende opmerkingen*

De projectaanvraag wordt vergund met een minderheidsstandpunt. Eén CCD-lid is van oordeel dat het testen en optimaliseren van voederstrategieën die specifiek gericht zijn op het ondersteunen van dieren in suboptimale managementcondities een houderijsysteem in stand houden dat onvoldoende tegemoet komt aan de huidige maatschappelijke ontwikkelingen op het gebied van duurzaamheid en dierenwelzijn. De ethische afweging omtrent de proeven in bijlage dierproeven 3.4.3.2 valt daarom voor dit lid negatief uit.

## Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven,

afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

**Datum:**  
20 maart 2023  
**Aanvraagnummer:**  
AVD **5.1 lid2e** 202316684

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](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: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**5.1 lid2e**

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2023 tot en met 31 mei 2028, voor het project "Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202316684, na advies van 5.1 lid2h De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2h

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 januari 2023
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 6 maart 2023;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Nutrient utilization model, zoals ontvangen op 6 maart 2023;
    - 3.4.3.2 Management model, zoals ontvangen op 6 maart 2023;
    - 3.4.3.3 E. coli challenge model, zoals ontvangen op 6 maart 2023;
    - 3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions, zoals ontvangen op 6 maart 2023;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 14 maart 2023;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 15 februari 2023
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 6 maart 2023, 14 maart 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Nutrient utilization model</b>			
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / Biggen tot 6 weken na spenen	888	100,0% Licht
<b>3.4.3.2 Management model</b>			
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / Biggen tot 6 weken na spenen	1.254	100,0% Licht
<b>3.4.3.3 E. coli challenge model</b>			
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / Biggen tot 6 weken na spenen	207	2,4% Ernstig 75,8% Matig 21,7% Licht
<b>3.4.3.4 Nitrogen balance optimal and suboptimal conditions</b>			
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	160	100,0% Matig

**Aanvraagnummer:** AVD<sup>51</sup> 202316684

## **Voorwaarden**

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

### **Geldende voorschriften**

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.





**Aanvraagnummer:**

AVD **5.1.1a2H** 202316684

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

### **Verzorging**

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

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

**Aanvraagnummer:**AVD <sup>5-1</sup> <sup>nd2H</sup> 202316684

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

**Einde van een dierproef**

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

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** woensdag 10 mei 2023 16:59  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202316684

Geachte 5.1 lid2h,

Op 06-01-2023 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Development of nutritional strategies to better meet piglet requirements after weaning, while increasing sustainability, performance, welfare, and health.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202316684.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de beslisstrategie omtrent go/no-go momenten, uitkomstparameters, huisvesting, voedselrestrictie, gekozen modellen, de humane eindpunten en de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 20-3-2023.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan.

Het DEC advies is niet geheel helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld en bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere uiteenzetting. Bij C10 hadden wij echter graag ook een oordeel teruggezien over de onderbouwing voor afwijkende huisvesting van de dieren.

De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen, maar gaat voorbij aan het ernstige ongerief dat de dieren in bijlage 3 zullen ondergaan. Ook hadden wij graag gezien dat het ernstige ongerief inhoudelijk was beoordeeld onder C11. In verband met dit ernstige ongerief is de beoordeling achteraf onder E1. een vereiste voorwaarde.

Het project richt zich op voeding voor biggen in de veehouderij. Daarmee speelt het ethische dilemma rondom de veehouderij ook bij dit project. Dit hadden wij graag in het advies teruggezien.

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