

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Aanvrager: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.a

Stadia van de proef:

08-02-2005	Aangemeld	[REDACTED]
24-02-2005	Te wijzigen	Secretaris van de DEC
24-02-2005	Gekopieerd	[REDACTED]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel [REDACTED], in samenwerking met de [REDACTED] en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het [REDACTED] programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van [REDACTED]. Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster [REDACTED].

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myeline membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamprey and Walker, 1978; Bourre et al, 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het nageslacht (Lamprey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al. (2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van n-6

hersteld kon worden door DHA supplementatie na het spenen van jonge ratten. DHA supplementatie bleek het referentiegeheugen in jonge ratten te verbeteren, maar niet het werkgeheugen (Gamoh et al., 1999). De effecten van DHA op cognitief gedrag worden waarschijnlijk veroorzaakt door een veranderd dopamine metabolisme (Ng and Innis, 2003). Naast effecten op het leervermogen en geheugen zijn er onder andere ook effecten van een n-3 tekort gevonden op exploratief gedrag in een nieuwe omgeving (een lage opname van n-3, specifiek tijdens ontwikkeling leidt tot minder exploratie in een nieuwe omgeving; Enslen et al., 1991) en stressrespons (een n-3-rijk dieet vermindert geconditioneerde angst; Takeuchi et al., 2003). In resusapen bleek DHA stereotiep gedrag te verminderen (Reisbick et al., 1994) en in mensen bleek DHA de toename van agressie onder omstandigheden van mentale stress te voorkomen (Hamazaki et al., 1996). Bij de samenstelling van zeugenvoeders wordt er nauwelijks aandacht besteedt aan het effect ervan op de neurale ontwikkeling en het gedrag van de biggen. Voeders zijn gebaseerd op granen, die geen n-3 vetzuren bevatten. Als voeders voor drachtige en lacterende zeugen voldoende n-3 vetzuren zouden bevatten, zouden de biggen een beter ontwikkeld neurale systeem kunnen hebben, wat resulteert in een beter leer- en adaptatievermogen. Dit kan vervolgens leiden tot een betere voeropname (de voerbak wordt eerder gevonden en de betekenis ervan wordt eerder begrepen) en een betere groei. Het leervermogen zou een indicator kunnen zijn voor de neurale ontwikkeling. Het gedrag en de (stress)respons van biggen op uitdagende omstandigheden (spenen) is indicatief voor het adaptatievermogen, dat als gevolg van een suboptimale neurale ontwikkeling aangetast kan zijn.

Hier is nauwelijks onderzoek naar gedaan in varkens. Doel van dit project is de effecten van verstrekking van n-3 vetzuren (DHA) aan de zeug tijdens de late dracht en de lactatie op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen te onderzoeken.

Literatuur

Bourre, J.-M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880-1892.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 1221-1229.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980b. Extrauterine fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 131-138.

Enslen, M., Milon, H., Malnoë, A., 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development of brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* 26, 203-208.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S., 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93, 237-241.

Hamazaki, T., Sawazaki, Sh, Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults; a placebo-controlled double-blind study. *J. Clin. Invest.* 97, 1129-1133.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474-480.

Lamptey, M.S., Walker, B.L., 1978. Learning behaviour and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth. *J. Nutr.* 108, 358-367.

Morgan, B.L.G., Oppenheimer, J., Winick, M., 1981. Effects of essential fatty acid deficiency during late gestation on brain N-acetylneuraminic acid metabolism and behaviour in the progeny. *Br. J. Nutr.* 46, 223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex

docosahexaenoic acid. J. Nutr., 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. Brain Behav. Evol. 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. Physiol. Behav. 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. Br. J. Nutr. 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphase myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. J. Neurochem. 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. Behav. Brain Res. 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. Brain Res. 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (spen)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-02-2005 tot 01-02-2006

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	120	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	120	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In de proef worden veertien zeugen gebruikt, waarvan twee reservedieren. Omdat het effect van voeding van de zeug tijdens de dracht op het gedrag en het leervermogen van de biggen wordt onderzocht worden biggen die deze zeugen werpen na twee achtereenvolgende drachten gebruikt. Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefhandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele

overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling).

Om de oestrus van de zeugen te synchroniseren zijn de zeugen reeds behandeld met Regumate en geïnsemineerd (rond 21 jan.; met toestemming van de art. 14 functionaris). Als blijkt dat er te veel terugkomers zijn (zodat er minder dan 12 zeugen overblijven voor de proef) zullen er extra drachtige zeugen aangekocht worden. Dit om het tijdstip van werpen gelijk te houden. De terugkomers worden dan uit de proef gehaald.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug (elke worp) de experimentele eenheid. De zeugen worden tweemaal gebruikt (twee worpen), dus $n=12$ per proefbehandeling. Met $n=12$ is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Een deel van de zeugen was reeds aanwezig op [REDACTED]. Er zijn extra zeugen aangekocht bij een gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf. Deze zeugen zijn inmiddels al aanwezig op [REDACTED], met toestemming van de art. 14 functionaris. Ze zijn de laatste week van december 2004 gearriveerd.

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). De eerste twee trimesters van de dracht krijgen ze een standaard zeugenvoer, het laatste trimester en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 70-75). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden gedurende twee drachten en lactaties gebruikt in de proef. De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n. docosahexaeenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag. Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.).

Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voerbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname (zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en dueren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct

geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewenning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. [REDACTED]). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	B. Gering/Matig
n-3 arm big	B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling an sich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan.

Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens intracardiaal T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart. Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen.

Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursors voor DHA synthese door de zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongebornen biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeboren biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- | | |
|---------------|--------------------------------------|
| n-3 rijk zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big | D. Is wel toegepast. |

Pijnbestrijding:

- | | |
|---------------|--|
| n-3 rijk zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de intracardiale toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [redacted]).

[redacted]. Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- | | |
|---------------|---|
| n-3 rijk zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 arm zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 rijk big | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 arm big | Het dier is na de proef in leven gelaten. |

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Er zijn geen betere alternatieven.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[redacted]

Diverse studenten

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2005015.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	120					01	4	1	2	3
n-3 arm big	1	42	1	120					01	4	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.b

Stadia van de proef:

24-02-2005	Aangemeld	
01-03-2005	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
31-05-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
31-05-2007	Eigenaar gewijzigd	beheerder van dit pakket
10-08-2007	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel , in samenwerking met de leerstoel en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van . Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster .

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myleline membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamptey and Walker, 1978, Bourre et al, 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het nageslacht (Lamptey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al.

(2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van n-6 hersteld kon worden door DHA supplementatie na het spenen van jonge ratten. DHA supplementatie bleek het referentiegeheugen in jonge ratten te verbeteren, maar niet het werkgeheugen (Gamoh et al., 1999). De effecten van DHA op cognitief gedrag worden waarschijnlijk veroorzaakt door een veranderd dopamine metabolisme (Ng and Innis, 2003). Naast effecten op het leervermogen en geheugen zijn er onder andere ook effecten van een n-3 tekort gevonden op exploratief gedrag in een nieuwe omgeving (een lage opname van n-3, specifiek tijdens ontwikkeling leidt tot minder exploratie in een nieuwe omgeving; Enslen et al., 1991) en stressrespons (een n-3-rijk dieet vermindert geconditioneerde angst; Takeuchi et al., 2003). In resusapen bleek DHA stereotiep gedrag te verminderen (Reisbick et al., 1994) en in mensen bleek DHA de toename van agressie onder omstandigheden van mentale stress te voorkomen (Hamazaki et al., 1996). Bij de samenstelling van zeugenvoeders wordt er nauwelijks aandacht besteedt aan het effect ervan op de neurale ontwikkeling en het gedrag van de biggen. Voeders zijn gebaseerd op granen, die geen n-3 vetzuren bevatten. Als voeders voor drachtige en lacterende zeugen voldoende n-3 vetzuren zouden bevatten, zouden de biggen een beter ontwikkeld neurale systeem kunnen hebben, wat resulteert in een beter leer- en adaptatievermogen. Dit kan vervolgens leiden tot een betere voeropname (de voerbak wordt eerder gevonden en de betekenis ervan wordt eerder begrepen) en een betere groei. Het leervermogen zou een indicator kunnen zijn voor de neurale ontwikkeling. Het gedrag en de (stress)respons van biggen op uitdagende omstandigheden (spenen) is indicatief voor het adaptatievermogen, dat als gevolg van een suboptimale neurale ontwikkeling aangetast kan zijn.

Hier is nauwelijks onderzoek naar gedaan in varkens. Doel van dit project is de effecten van verstrekking van n-3 vetzuren (DHA) aan de zeug tijdens de late dracht en de lactatie op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen te onderzoeken.

Literatuur

Bourre, J.-M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880-1892.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 1221-1229.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980b. Extrauterine fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 131-138.

Enslen, M., Milon, H., Malnoš, A., 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development of brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* 26, 203-208.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S., 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93, 237-241.

Hamazaki, T., Sawazaki, Sh., Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults; a placebo-controlled double-blind study. *J. Clin. Invest.* 97, 1129-1133.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474-480.

Lamprey, M.S., Walker, B.L., 1978. Learning behaviour and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth. *J. Nutr.* 108, 358-367.

Morgan, B.L.G., Oppenheimer, J., Winick, M., 1981. Effects of essential fatty acid deficiency during late gestation on brain N-acetylneuraminic acid metabolism and behaviour in the progeny. *Br. J. Nutr.* 46, 223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid. *J. Nutr.*, 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav. Evol.* 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. *Physiol. Behav.* 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. *Br. J. Nutr.* 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphase myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. *J. Neurochem.* 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (spoon)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Leksamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-03-2005 tot 01-02-2006

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
n-3 arm big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer die gebruikt worden voor hersenanalyse

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In de proef worden veertien zeugen gebruikt, waarvan twee reservedieren. Omdat het effect van voeding van de zeug tijdens de dracht op het gedrag en het leervermogen van de biggen wordt onderzocht worden biggen die deze zeugen werpen na twee achtereenvolgende drachten gebruikt. Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefhandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling, waarvan 12 dieren worden opgeofferd).

Om de oestrus van de zeugen te synchroniseren zijn de zeugen reeds behandeld met Regumate en geïnsemineerd (rond 21 jan.; met toestemming van de art. 14 functionaris). Als blijkt dat er te veel terugkomers zijn (zodat er minder dan 12 zeugen overblijven voor de proef) zullen er extra drachtige zeugen aangekocht worden. Dit om het tijdstip van werpen gelijk te houden. De terugkomers worden dan uit de proef gehaald.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug (elke worp) de experimentele eenheid. De zeugen worden tweemaal gebruikt (twee worpen), dus $n=12$ per proefbehandeling. Met $n=12$ is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Een deel van de zeugen was reeds aanwezig op [REDACTED]. Er zijn extra zeugen aangekocht bij een gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf. Deze zeugen zijn inmiddels al aanwezig op, met

toestemming van de art. 14 functionaris. Ze zijn de laatste week van december 2004 gearriveerd.

5.a. Accommodatie:

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). Het eerste deel van de dracht (60 d) krijgen ze een standaard voer voor drachtige zeugen, het laatste deel van de dracht en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 60-65). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden gedurende twee drachten en lactaties gebruikt in de proef. De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n. docosahexaeenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag. Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.). Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voerbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname

(zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en uren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewinning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. [REDACTED]). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 rijk big hersenen	C. Matig
n-3 arm big hersenen	C. Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling an sich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan.

Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens intracardiaal T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart. Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen.

Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursors voor DHA synthese door de

zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongeboren biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeboren biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| n-3 rijk zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big hersenen | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big hersenen | D. Is wel toegepast. |

Pijnbestrijding:

- | | |
|-----------------------|--|
| n-3 rijk zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de intracardiale toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [redacted] en [redacted]). Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen. [redacted] (art. 12) zal de anaesthesie en euthanasie uitvoeren. Zij is zeer bekwaam in deze handelingen.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- | | |
|-----------------------|---|
| n-3 rijk zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 arm zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 rijk big | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 arm big | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 rijk big hersenen | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |
| n-3 arm big hersenen | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Het varken is het doeldier in deze proef. Daarom kan er geen gebruik gemaakt worden van andere diersoorten of een proef zonder dieren. Er is advies ingewonnen van deskundigen van [redacted]

[REDACTED]

1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 rijk big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
n-3 arm big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

[Redacted]

Aanvrager:

Afdeling:

[Redacted]

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.c

Stadia van de proef:

10-08-2007	Aangemeld	[Redacted]
14-08-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
20-08-2007	Gekopieerd	[Redacted]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel [Redacted], in samenwerking met de leerstoel [Redacted] en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het [Redacted] programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van [Redacted]. Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster [Redacted].

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myleine membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamprey and Walker, 1978; Bourre et al, 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het nageslacht (Lamprey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al. (2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van

n-6 hersteld kon worden door DHA supplementatie na het spenen van jonge ratten. DHA supplementatie bleek het referentiegeheugen in jonge ratten te verbeteren, maar niet het werkgeheugen (Gamoh et al., 1999). De effecten van DHA op cognitief gedrag worden waarschijnlijk veroorzaakt door een veranderd dopamine metabolisme (Ng and Innis, 2003). Naast effecten op het leervermogen en geheugen zijn er onder andere ook effecten van een n-3 tekort gevonden op exploratief gedrag in een nieuwe omgeving (een lage opname van n-3, specifiek tijdens ontwikkeling leidt tot minder exploratie in een nieuwe omgeving; Enslen et al., 1991) en stressrespons (een n-3-rijk dieet vermindert geconditioneerde angst; Takeuchi et al., 2003). In resusapen bleek DHA stereotiep gedrag te verminderen (Reisbick et al., 1994) en in mensen bleek DHA de toename van agressie onder omstandigheden van mentale stress te voorkomen (Hamazaki et al., 1996).

Bij de samenstelling van zeugenvoeders wordt er nauwelijks aandacht besteedt aan het effect ervan op de neurale ontwikkeling en het gedrag van de biggen. Voeders zijn gebaseerd op granen, die geen n-3 vetzuren bevatten. Als voeders voor drachtige en lacterende zeugen voldoende n-3 vetzuren zouden bevatten, zouden de biggen een beter ontwikkeld neurale systeem kunnen hebben, wat resulteert in een beter leer- en adaptatievermogen. Dit kan vervolgens leiden tot een betere voeropname (de voerbak wordt eerder gevonden en de betekenis ervan wordt eerder begrepen) en een betere groei. Het leervermogen zou een indicator kunnen zijn voor de neurale ontwikkeling. Het gedrag en de (stress)respons van biggen op uitdagende omstandigheden (spenen) is indicatief voor het adaptatievermogen, dat als gevolg van een suboptimale neurale ontwikkeling aangetast kan zijn. Hier is nauwelijks onderzoek naar gedaan in varkens. Doel van dit project is de effecten van verstrekking van n-3 vetzuren (DHA) aan de zeug tijdens de late dracht en de lactatie op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen te onderzoeken.

Literatuur

Bourre, J.-M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880-1892.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 1221-1229.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980b. Extrauterine fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 131-138.

Enslen, M., Milon, H., Malnoë, A., 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development of brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* 26, 203-208.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S., 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93, 237-241.

Hamazaki, T., Sawazaki, Sh., Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults; a placebo-controlled double-blind study. *J. Clin. Invest.* 97, 1129-1133.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474-480.

Lamptey, M.S., Walker, B.L., 1978. Learning behaviour and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth. *J. Nutr.* 108, 358-367.

Morgan, B.L.G., Oppenheimer, J., Winick, M., 1981. Effects of essential fatty acid deficiency during late gestation on brain N-acetylneuraminic acid metabolism and behaviour in the progeny. *Br. J. Nutr.* 46, 223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid. *J. Nutr.*, 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav. Evol.* 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. *Physiol. Behav.* 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. *Br. J. Nutr.* 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphasic myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. *J. Neurochem.* 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (spree)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 11-08-2007 tot 01-05-2008

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big hersenen worden voor hersenanalyse	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
n-3 arm big hersenen worden voor hersenanalyse	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer die gebruikt worden voor hersenanalyse

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In de proef worden veertien zeugen gebruikt, waarvan twee reservedieren. Omdat het effect van voeding van de zeug tijdens de dracht op het gedrag en het leervermogen van de biggen wordt onderzocht worden biggen die deze zeugen werpen na twee achtereenvolgende drachten gebruikt. Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefhandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling, waarvan 12 dieren worden opgeofferd).

Om de oestrus van de zeugen te synchroniseren zijn de zeugen reeds behandeld met Regumate en geïnsemineerd (rond 21 jan.; met toestemming van de art. 14 functionaris). Als blijkt dat er te veel terugkomers zijn (zodat er minder dan 12 zeugen overblijven voor de proef) zullen er extra drachtige zeugen aangekocht worden. Dit om het tijdstip van werpen gelijk te houden. De terugkomers worden dan uit de proef gehaald.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug (elke worp) de experimentele eenheid. De zeugen worden tweemaal gebruikt (twee worpen), dus $n=12$ per proefbehandeling. Met $n=12$ is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Een deel van de zeugen was reeds aanwezig op [REDACTED]. Er zijn extra zeugen aangekocht bij

een gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf. Deze zeugen zijn inmiddels al aanwezig op [REDACTED], met toestemming van de art. 14 functionaris. Ze zijn de laatste week van december 2004 gearriveerd.

5.a. Accommodatie: [REDACTED]

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). Het eerste deel van de dracht (60 d) krijgen ze een standaard voer voor vruchtige zeugen, het laatste deel van de dracht en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 60-65). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden gedurende twee drachten en lactaties gebruikt in de proef. De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n. docosahexaeenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag. Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.).

Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke

en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voerbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname (zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en uren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewinning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. [REDACTED]). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 rijk big hersenen	C. Matig
n-3 arm big hersenen	C. Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling an sich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan.

Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens intracardiaal T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart. Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen.

Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursors voor DHA synthese door de zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongeboorte biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeborene biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| n-3 rijk zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big hersenen | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big hersenen | D. Is wel toegepast. |

Pijnbestrijding:

- | | |
|-----------------------|--|
| n-3 rijk zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de intracardiale toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [REDACTED]).

[REDACTED]. Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen. [REDACTED] (art. 12) zal de anaesthesie en euthanasie uitvoeren. Zij is zeer bekwaam in deze handelingen.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- | | |
|-----------------------|---|
| n-3 rijk zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 arm zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 rijk big | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 arm big | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
| n-3 rijk big hersenen | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |
| n-3 arm big hersenen | Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef. |

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Het varken is het doeldier in deze proef. Daarom kan er geen gebruik gemaakt worden van andere diersoorten of een proef zonder dieren. Er is advies ingewonnen van deskundigen van [REDACTED] m.b.t. anaesthesie en euthanasie van de selectie biggen. De methode die is gekozen, veroorzaakt minimaal ongerief voor de biggen. De holeboard test voor leervermogen en geheugen is in de afgelopen jaren in diverse proeven bij de leerstoel [REDACTED] gebruikt. Aanbevelingen voor verbetering van deze methode in rapportages van deze proeven hebben geleid tot steeds verdere verfijning van de test. Het aantal te gebruiken dieren is zodanig gekozen, dat met een minimaal aantal dieren toch voldoende contrast in de effecten van de proefbehandelingen kan worden aangetoond. Hiervoor is relevante literatuur geraadpleegd (zie toelichting voor het aantal gebruikte dieren).

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Diverse studenten [REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2005015.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 rijk big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
n-3 arm big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

[Redacted]

Aanvrager:

Afdeling:

[Redacted]

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen (2e ronde)

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.d

Stadia van de proef:

20-08-2007	Aangemeld	[Redacted]
21-08-2007	Wijzigen	Secretaris van de DEC
23-08-2007	Gekopieerd	[Redacted]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel [Redacted], in samenwerking met de leerstoel [Redacted] en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het [Redacted] programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van [Redacted]. Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster [Redacted].

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myeline membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamprey and Walker, 1978; Bourre et al., 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het nageslacht (Lamprey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al. (2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van

n-6 hersteld kon worden door DHA supplementatie na het spenen van jonge ratten. DHA supplementatie bleek het referentiegeheugen in jonge ratten te verbeteren, maar niet het werkgeheugen (Gamoh et al., 1999). De effecten van DHA op cognitief gedrag worden waarschijnlijk veroorzaakt door een veranderd dopamine metabolisme (Ng and Innis, 2003). Naast effecten op het leervermogen en geheugen zijn er onder andere ook effecten van een n-3 tekort gevonden op exploratief gedrag in een nieuwe omgeving (een lage opname van n-3, specifiek tijdens ontwikkeling leidt tot minder exploratie in een nieuwe omgeving; Enslen et al., 1991) en stressrespons (een n-3-rijk dieet vermindert geconditioneerde angst; Takeuchi et al., 2003). In resusapen bleek DHA stereotiep gedrag te verminderen (Reisbick et al., 1994) en in mensen bleek DHA de toename van agressie onder omstandigheden van mentale stress te voorkomen (Hamazaki et al., 1996).

Bij de samenstelling van zeugenvoeders wordt er nauwelijks aandacht besteedt aan het effect ervan op de neurale ontwikkeling en het gedrag van de biggen. Voeders zijn gebaseerd op granen, die geen n-3 vetzuren bevatten. Als voeders voor drachtige en lacterende zeugen voldoende n-3 vetzuren zouden bevatten, zouden de biggen een beter ontwikkeld neurale systeem kunnen hebben, wat resulteert in een beter leer- en adaptatievermogen. Dit kan vervolgens leiden tot een betere voeropname (de voerbak wordt eerder gevonden en de betekenis ervan wordt eerder begrepen) en een betere groei. Het leervermogen zou een indicator kunnen zijn voor de neurale ontwikkeling. Het gedrag en de (stress)respons van biggen op uitdagende omstandigheden (spenen) is indicatief voor het adaptatievermogen, dat als gevolg van een suboptimale neurale ontwikkeling aangetast kan zijn. Hier is nauwelijks onderzoek naar gedaan in varkens. Doel van dit project is de effecten van verstrekking van n-3 vetzuren (DHA) aan de zeug tijdens de late dracht en de lactatie op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen te onderzoeken.

Literatuur

Bourre, J.-M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880-1892.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 1221-1229.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980b. Extrauterine fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 131-138.

Enslen, M., Milon, H., Malnoš, A., 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development of brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* 26, 203-208.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S., 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93, 237-241.

Hamazaki, T., Sawazaki, Sh., Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults; a placebo-controlled double-blind study. *J. Clin. Invest.* 97, 1129-1133.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474-480.

Lamprey, M.S., Walker, B.L., 1978. Learning behaviour and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth. *J. Nutr.* 108, 358-367.

Morgan, B.L.G., Oppenheimer, J., Winick, M., 1981. Effects of essential fatty acid deficiency during late gestation on brain N-acetylneuraminic acid metabolism and behaviour in the progeny. *Br. J. Nutr.* 46, 223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid. *J. Nutr.*, 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav. Evol.* 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. *Physiol. Behav.* 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. *Br. J. Nutr.* 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphasic myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. *J. Neurochem.* 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (speen)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 21-08-2007 tot 01-04-2008

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	7	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	54	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	54	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big hersenen	6	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
n-3 arm big hersenen	6	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
zeug	2	varkens	reservedieren

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Het gaat om de tweede ronde van het experiment waarvan in 2005 de eerste ronde is uitgevoerd.

In deze ronde worden veertien zeugen gebruikt, waarvan tot aan werpen twee reservedieren (een op n-3 arm en een op n-3 rijk voer). Om 14 drachtige zeugen te verkrijgen, worden 16 zeugen aangekocht en geïnsemineerd (twee reserve zeugen indien niet alle zeugen drachtig worden). Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefhandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt voor 2 rondes, voor deze 2e ronde dus 54 per proefbehandeling. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling, waarvan 12 dieren worden opgeofferd).

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug de experimentele eenheid. Voor de hele proef geldt $n=12$ per proefbehandeling; voor de 2e ronde dus $n=6$ per behandeling. Met $n=12$ is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Afkomstig van gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf.

5.a. Accommodatie:

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). Het eerste deel van de dracht (60 d) krijgen ze een standaard voer voor drachtige zeugen, het laatste deel van de dracht en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 60-65). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n. docosahexaenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag. Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.).

Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voorbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van

mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname (zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en uren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewenning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. ██████████). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 rijk big hersenen	C. Matig
n-3 arm big hersenen	C. Matig
zeug	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling an sich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan. Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart. Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen

van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen. Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursors voor DHA synthese door de zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongeboren biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeboren biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- n-3 rijk zeug A. Niet toegepast (geen aanleiding).
- n-3 arm zeug A. Niet toegepast (geen aanleiding).
- n-3 rijk big A. Niet toegepast (geen aanleiding).
- n-3 arm big A. Niet toegepast (geen aanleiding).
- n-3 rijk big hersenen D. Is wel toegepast.
- n-3 arm big hersenen D. Is wel toegepast.
- zeug D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

- n-3 rijk zeug A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- n-3 arm zeug A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- n-3 rijk big A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- n-3 arm big A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- n-3 rijk big hersenen A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- n-3 arm big hersenen A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- zeug A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [redacted]). Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen. [redacted] (art. 12) zal de anaesthesie en euthanasie uitvoeren. Zij is zeer bekwaam in deze handelingen.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- n-3 rijk zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.
- n-3 arm zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.
- n-3 rijk big Het dier is na de proef in leven gelaten.
- n-3 arm big Het dier is na de proef in leven gelaten.
- n-3 rijk big hersenen Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- n-3 arm big hersenen Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
- zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Het varken is het doeldier in deze proef. Daarom kan er geen gebruik gemaakt worden van andere diersoorten of een proef zonder dieren. Er is advies ingewonnen van deskundigen van [REDACTED] m.b.t. anaesthesie en euthanasie van de selectie biggen. De methode die is gekozen, veroorzaakt minimaal ongerief voor de biggen. De holeboard test voor leervermogen en geheugen is in de afgelopen jaren in diverse proeven bij de leerstoel [REDACTED] gebruikt. Aanbevelingen voor verbetering van deze methode in rapportages van deze proeven hebben geleid tot steeds verdere verfijning van de test. Het aantal te gebruiken dieren is zodanig gekozen, dat met een minimaal aantal dieren toch voldoende contrast in de effecten van de proefbehandelingen kan worden aangetoond. Hiervoor is relevante literatuur geraadpleegd (zie toelichting voor het aantal gebruikte dieren).

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Diverse studenten [REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2005015.d (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	7					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	54					01	1	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	54					01	1	1	3	3
n-3 rijk big hersenen	1	42	1	6					01	4	1	3	1
n-3 arm big hersenen	1	42	1	6					01	4	1	3	1
zeug	1	42	1	2					01	4	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.e

Stadia van de proef:

23-08-2007	Aangemeld	
23-08-2007	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
07-02-2008	Wijzigen	
07-02-2008	Gekopieerd	
07-02-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel [redacted], in samenwerking met de leerstoel [redacted] en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het [redacted] programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van [redacted]. Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster [redacted].

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myeline membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamptey and Walker, 1978, Bourre et al, 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het

nageslacht (Lamprey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al. (2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van n-6 hersteld kon worden door DHA supplementatie na het spenen van jonge ratten. DHA supplementatie bleek het referentiegeheugen in jonge ratten te verbeteren, maar niet het werkgeheugen (Gamoh et al., 1999). De effecten van DHA op cognitief gedrag worden waarschijnlijk veroorzaakt door een veranderd dopamine metabolisme (Ng and Innis, 2003). Naast effecten op het leervermogen en geheugen zijn er onder andere ook effecten van een n-3 tekort gevonden op exploratief gedrag in een nieuwe omgeving (een lage opname van n-3, specifiek tijdens ontwikkeling leidt tot minder exploratie in een nieuwe omgeving; Enslen et al., 1991) en stressrespons (een n-3-rijk dieet vermindert geconditioneerde angst; Takeuchi et al., 2003). In resusapen bleek DHA stereotiep gedrag te verminderen (Reisbick et al., 1994) en in mensen bleek DHA de toename van agressie onder omstandigheden van mentale stress te voorkomen (Hamazaki et al., 1996).

Bij de samenstelling van zeugenvoeders wordt er nauwelijks aandacht besteedt aan het effect ervan op de neurale ontwikkeling en het gedrag van de biggen. Voeders zijn gebaseerd op granen, die geen n-3 vetzuren bevatten. Als voeders voor drachtige en lacterende zeugen voldoende n-3 vetzuren zouden bevatten, zouden de biggen een beter ontwikkeld neurale systeem kunnen hebben, wat resulteert in een beter leer- en adaptatievermogen. Dit kan vervolgens leiden tot een betere voeropname (de voerbak wordt eerder gevonden en de betekenis ervan wordt eerder begrepen) en een betere groei. Het leervermogen zou een indicator kunnen zijn voor de neurale ontwikkeling. Het gedrag en de (stress)respons van biggen op uitdagende omstandigheden (spenen) is indicatief voor het adaptatievermogen, dat als gevolg van een suboptimale neurale ontwikkeling aangetast kan zijn. Hier is nauwelijks onderzoek naar gedaan in varkens. Doel van dit project is de effecten van verstrekking van n-3 vetzuren (DHA) aan de zeug tijdens de late dracht en de lactatie op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen te onderzoeken.

Literatuur

Bourre, J.-M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880-1892.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 1221-1229.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980b. Extrauterine fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 131-138.

Enslen, M., Milon, H., Malnoë, A., 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development of brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* 26, 203-208.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S., 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93, 237-241.

Hamazaki, T., Sawazaki, Sh., Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults; a placebo-controlled double-blind study. *J. Clin. Invest.* 97, 1129-1133.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474-480.

Lamprey, M.S., Walker, B.L., 1978. Learning behaviour and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth. *J. Nutr.* 108, 358-367.

Morgan, B.L.G., Oppenheimer, J., Winick, M., 1981. Effects of essential fatty acid deficiency during late

gestation on brain N-acetylneuraminic acid metabolism and behaviour in the progeny. Br. J. Nutr. 46, 223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid. J. Nutr., 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. Brain Behav. Evol. 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. Physiol. Behav. 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. Br. J. Nutr. 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphasic myelination and the fatty acid composition of cerebrosides and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. J. Neurochem. 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. Behav. Brain Res. 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. Brain Res. 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (spoon)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 24-08-2007 tot 23-04-2008

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	14	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	14	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
n-3 arm big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer die gebruikt worden voor hersenanalyse

worden voor hersenanalyse

zeug 2

varkens

reservedieren voor tweede ronde

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

De aantallen dieren betreffen de aantallen voor het gehele experiment (ronde 1 en ronde 2). De eerste ronde van het experiment is reeds uitgevoerd in 2005 volgens planning (met $n=14$ zeugen en $n=54$ biggen). De planning was destijds om dezelfde 14 zeugen te herinsemineren voor de tweede ronde. Omdat de tweede ronde van het experiment wegens omstandigheden pas in 2007-2008 wordt uitgevoerd (hierover is in 2005 en ook recent met de DEC gecorrespondeerd), worden er nieuwe zeugen aangekocht.

In de tweede ronde worden 14 zeugen gebruikt, waarvan tot aan werpen twee reservedieren (een op n-3 arm en een op n-3 rijk voer). Om 14 drachtige zeugen te verkrijgen, worden 16 zeugen aangekocht en geïnsemineerd (twee reserve zeugen indien niet alle zeugen drachtig worden). Uiteindelijk worden van $n=12$ tomen biggen blootgesteld aan de proefbehandelingen. Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefbehandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt voor 2 rondes, voor deze 2e ronde dus 54 per proefbehandeling. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling, waarvan 12 dieren worden opgeofferd).

Wijziging t.o.v. het oorspronkelijke protocol in 2005 is dus de aankoop van 14 zeugen die op proefvoer worden gezet (i.p.v. hergebruik 14 zeugen) plus 2 reservezeugen voor inseminatie (om 14 drachtige zeugen te verkrijgen). De proefbehandeling van de biggen is niet gewijzigd t.o.v. het oorspronkelijke, door de DEC reeds goedgekeurde, protocol.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug de experimentele eenheid. Voor de hele proef geldt $n=12$ per proefbehandeling; voor de 2e ronde dus $n=6$ per behandeling. Met $n=12$ is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Afkomstig van gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf.

5.a. Accommodatie:

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). Het eerste deel van de dracht (60 d) krijgen ze een standaard voer voor drachtige zeugen, het laatste deel van de dracht en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 60-65). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n. docosahexaeenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren

vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag. Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.).

Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voerbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname (zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en dueren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewenning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. [REDACTED]). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 rijk big hersenen	C. Matig
n-3 arm big hersenen	C. Matig
zeug	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling aan zich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid

van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan.

Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart. Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen.

Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursors voor DHA synthese door de zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongeborene biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeborene biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| n-3 rijk zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big hersenen | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big hersenen | D. Is wel toegepast. |
| zeug | D. Is wel toegepast. |

Pijnbestrijding:

- | | |
|-----------------------|--|
| n-3 rijk zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [redacted]).

Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen. [redacted] (art. 12) zal de anaesthesie en euthanasie uitvoeren. Zij is zeer bekwaam in deze handelingen.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- | | |
|---------------|---|
| n-3 rijk zeug | Het dier is na de proef in leven gelaten. |
|---------------|---|

n-3 arm zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm big Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big hersenen Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
n-3 arm big hersenen Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Het varken is het doeldier in deze proef. Daarom kan er geen gebruik gemaakt worden van andere diersoorten of een proef zonder dieren. Er is advies ingewonnen van deskundigen van [REDACTED] m.b.t. anaesthesie en euthanasie van de selectie biggen. De methode die is gekozen, veroorzaakt minimaal ongerief voor de biggen. De holeboard test voor leervermogen en geheugen is in de afgelopen jaren in diverse proeven bij de leerstoel [REDACTED] gebruikt. Aanbevelingen voor verbetering van deze methode in rapportages van deze proeven hebben geleid tot steeds verdere verfijning van de test. Het aantal te gebruiken dieren is zodanig gekozen, dat met een minimaal aantal dieren toch voldoende contrast in de effecten van de proefbehandelingen kan worden aangetoond. Hiervoor is relevante literatuur geraadpleegd (zie toelichting voor het aantal gebruikte dieren).

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Diverse studenten [REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2005015.e (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	14					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	14					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 rijk big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
n-3 arm big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
zeug	1	42	1	2					01	4	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Aanvrager: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.f

Stadia van de proef:

07-02-2008	Aangemeld	[REDACTED]
11-02-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
13-02-2008	Gekopieerd	[REDACTED]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel [REDACTED], in samenwerking met de leerstoel [REDACTED] en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het [REDACTED] programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van [REDACTED]. Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster [REDACTED]

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myeline membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamptey and Walker, 1978, Bourre et al, 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het nageslacht (Lamptey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al. (2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van

223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid. *J. Nutr.*, 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav. Evol.* 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. *Physiol. Behav.* 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. *Br. J. Nutr.* 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphase myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. *J. Neurochem.* 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (spoon)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 08-02-2008 tot 23-04-2008

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	14	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	14	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	108	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
n-3 arm big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer die gebruikt worden voor hersenanalyse

zeug 2 varkens reservedieren voor tweede ronde

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

De aantallen dieren betreffen de aantallen voor het gehele experiment (ronde 1 en ronde 2). De eerste ronde van het experiment is reeds uitgevoerd in 2005 volgens planning (met n=14 zeugen en n=54 biggen). De planning was destijds om dezelfde 14 zeugen te herinsemineren voor de tweede ronde. Omdat de tweede ronde van het experiment wegens omstandigheden pas in 2007-2008 wordt uitgevoerd (hierover is in 2005 en ook recent met de DEC gecorrespondeerd), worden er nieuwe zeugen aangekocht.

In de tweede ronde worden 14 zeugen gebruikt, waarvan tot aan werpen twee reservedieren (een op n-3 arm en een op n-3 rijk voer). Om 14 drachtige zeugen te verkrijgen, worden 16 zeugen aangekocht en geïnsemineerd (twee reserve zeugen indien niet alle zeugen drachtig worden). Uiteindelijk worden van n=12 tomen biggen blootgesteld aan de proefbehandelingen. Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefhandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt voor 2 rondes, voor deze 2e ronde dus 54 per proefbehandeling. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling, waarvan 12 dieren worden opgeofferd).

Wijziging t.o.v. het oorspronkelijke protocol in 2005 is dus de aankoop van 14 zeugen die op proefvoer worden gezet (i.p.v. hergebruik 14 zeugen) plus 2 reservezeugen voor inseminatie (om 14 drachtige zeugen te verkrijgen). De proefbehandeling van de biggen is niet gewijzigd t.o.v. het oorspronkelijke, door de DEC reeds goedgekeurde, protocol.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug de experimentele eenheid. Voor de hele proef geldt n=12 per proefbehandeling; voor de 2e ronde dus n=6 per behandeling. Met n=12 is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Afkomstig van gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf.

5.a. Accommodatie:

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). Het eerste deel van de dracht (60 d) krijgen ze een standaard voer voor drachtige zeugen, het laatste deel van de dracht en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 60-65). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n. docosahexaeenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.).

Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voerbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname (zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en dueren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

Van deze gemengde dieren zullen op 11-12 weken leeftijd 36 dieren (18 DHA-groep, 18 controlegroep) blootgesteld worden aan een niet-infectieuze milde immuunchallenge met LPS (2 microgram per kg lichaamsgewicht, i.v. in 200 microliter fysiologisch zout). De verwachting is dat de immuun- en gedragsparameters 12 uur na blootstelling weer op basaal niveau zijn; er kan een koortsreactie optreden die na max 8 uur verdwenen is (dit gebaseerd op een vergelijkbare proef door De Groot et al. 1997, *Physiol & Behav* 90:612-618) waarin dieren van vergelijkbare leeftijd/ras werden gebruikt). Twaalf andere dieren (6 DHA-groep, 6 controlegroep) krijgen een injectie met fysiologisch zout ter controle (ook i.v., 200 microliter). Alle dieren worden op de dag van en de dag voor de challenge getemperatuurd (rectaal en oor) en speekselmonsters voor cortisolbepaling worden genomen voor bepaling van basaalwaarden, op dezelfde tijdstippen als op de dag van challenge (op t=-1 uur, 1, 3, 6 en 8 uur na challenge). Verder wordt nog eenmaal op de dag na challenge een speekselmonster genomen + getemperatuurd. Een human approach test wordt uitgevoerd en de tijd tot aanraken van een bekende persoon die het hok binnenstapt wordt bepaald als indicatie van de gedragsmatige sicknessrespons (controledieren komen snel op een bekende persoon af, dieren met een sickness response niet, zie ook De Groot et al. 2007). Deze test wordt uitgevoerd op de dag voor challenge eenmaal, en op t=-1 uur, 1, 3, 6, 8 uur na challenge en eenmaal op de dag erna, en zal worden gecombineerd met het nemen van speekselmonsters (getrainde varkens kauwen graag op wattenstaafjes). Bloed voor bepaling van pro-inflammatoire cytokines IL-1, IL-6, en TNF-alfa wordt eenmaal afgenomen van alle dieren op de dag voor challenge, en eenmaal op de dag van challenge, waarbij dieren worden verdeeld over de tijdstippen t=1, 3 en 6 uur na challenge.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewinning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. [REDACTED]). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 rijk big hersenen	C. Matig
n-3 arm big hersenen	C. Matig
zeug	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling an sich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan.

Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart.

Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Ongerief t.g.v. de LPS-challenge bij deze dieren bestaat uit

- I.v. injectie (inclusief fixatie dieren)
- Bloedafname (op dag van injectie en de dag ervoor, aan 2 verschillende zijden)
- Sickness reactie op LPS (mogelijk koorts) voor n=36
- Mogelijk stress door meten lichaamstemperatuur

Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen. Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursoren voor DHA synthese door de zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongeboorte biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeborene biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

n-3 rijk zeug	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
n-3 arm zeug	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

n-3 rijk big A. Niet toegepast (geen aanleiding).
n-3 arm big A. Niet toegepast (geen aanleiding).
n-3 rijk big hersenen D. Is wel toegepast.
n-3 arm big hersenen D. Is wel toegepast.
zeug D. Is wel toegepast.

Pijnbestrijding:

n-3 rijk zeug A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
n-3 arm zeug A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
n-3 rijk big A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
n-3 arm big A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
n-3 rijk big hersenen A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
n-3 arm big hersenen A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
zeug A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [REDACTED]). Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen. [REDACTED] (art. 12) zal de anaesthesie en euthanasie uitvoeren. Zij is zeer bekwaam in deze handelingen.

De biggen die worden blootgesteld aan LPS-challenge laten we wennen aan de mensen die handelingen uitvoeren, waardoor stress door fixatie en temperaturen zo laag mogelijk zijn. Verder wordt er geoefend met het nemen van speekselmonsters zodat dit geen stress oplevert. We hebben gekozen voor een niet-infectieuze, milde en kortdurende (reacties naar verwachting max. 8-12 uur) LPS-challenge. De dosis is dusdanig gekozen dat er een immuun- en gedragsreactie optreedt, maar dat dieren niet echt heel ziek worden of moeten overgeven, en is ca. 50 x lager dan in vergelijkbare experimenten gebruikelijk is.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

n-3 rijk zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm big Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big hersenen Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
n-3 arm big hersenen Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
zeug Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Het varken is het doeldier in deze proef. Daarom kan er geen gebruik gemaakt worden van andere diersoorten of een proef zonder dieren. Er is advies ingewonnen van deskundigen van [REDACTED] m.b.t. anaesthesie en euthanasie van de selectie biggen. De methode die is gekozen, veroorzaakt minimaal ongerief voor de biggen. De holeboard test voor leervermogen en geheugen is in de afgelopen jaren in diverse proeven bij de leerstoel [REDACTED] gebruikt. Aanbevelingen

voor verbetering van deze methode in rapportages van deze proeven hebben geleid tot steeds verdere verfijning van de test. Het aantal te gebruiken dieren is zodanig gekozen, dat met een minimaal aantal dieren toch voldoende contrast in de effecten van de proefbehandelingen kan worden aangetoond. Hiervoor is relevante literatuur geraadpleegd (zie toelichting voor het aantal gebruikte dieren).

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[Redacted text block]

Diverse studenten [Redacted text block]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2005015.f (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	14					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	14					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	108					01	1	1	3	3
n-3 rijk big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
n-3 arm big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
zeug	1	42	1	2					01	4	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Aanvrager: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Titel dierproef: Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen

Aanmeldcode / Protocol: 2005015.g

Stadia van de proef:

13-02-2008 Aangemeld [REDACTED]
13-02-2008 Goedgekeurd [REDACTED]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Het onderzoek wordt uitgevoerd door de leerstoel [REDACTED], in samenwerking met de leerstoel [REDACTED] en is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit door onderzoekers van beide groepen. Het onderzoek valt binnen het [REDACTED] programma 'Behavioural needs, priorities and pleasure. Implications for welfare.' Daarnaast is het onderzoeken van de invloed van voeding op het gedrag en welzijn van dieren een speerpunt van [REDACTED]. Het proefplan van deze proef is ook gepresenteerd aan onderzoekers in het cluster [REDACTED].

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t.van dieren

Biggen worden in hun vroege leven blootgesteld aan vele stressvolle omstandigheden. Vooral het spenen op jonge leeftijd en het mengen met onbekende soortgenoten zijn erg stressvol. De biggen hebben moeite zich aan te passen aan deze situatie, wat resulteert in een matig welzijn. Het vroege spenen veroorzaakt ook een lage voeropname, omdat de biggen snel moeten omschakelen van het drinken van melk bij de moeder naar het opnemen van vast voedsel. Dit resulteert in gezondheidsproblemen en een beperkte groei. Een suboptimale neurale ontwikkeling kan een oorzaak zijn voor de beperkte aanpassing aan deze stressvolle situaties. Uit studies met ratten en mensen is bekend dat maternale opname van essentiële n-3 meervoudig onverzadigde vetzuren, en voornamelijk docosahexaeenzuur (DHA, C22:6 n-3), belangrijk is voor optimale neurale ontwikkeling in het nageslacht. DHA is een essentieel bestanddeel van neurale niet-myleine membranen en de retina. Er is in zowel mensen als varkens aangetoond dat deze vetzuren voornamelijk ingebouwd worden in het laatste trimester van de zwangerschap en vlak na de geboorte (Clandinin et al., 1980 a,b, in Innis, 2000; Sweasey et al., 1976; Passingham, 1985 in Rooke et al., 2001). In verschillende studies met ratten is aangetoond dat een tekort aan n-3 vetzuren een negatief effect heeft op het leervermogen en geheugen (e.g. Lamptey and Walker, 1978; Bourre et al, 1989; Gamoh et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). Vooral een tekort aan essentiële vetzuren (er is niet specifiek naar n-3 vetzuren gekeken) gedurende de dracht heeft een irreversibel negatief effect op het leervermogen van het nageslacht (Lamptey and Walker, 1978; Morgan et al., 1981). Echter, in een studie van Takeuchi et al. (2002) bleek een verminderd leervermogen, geïnduceerd door een n-3 deficiëntie in aanwezigheid van n-6 hersteld kon worden door DHA supplementatie na het spenen van jonge ratten. DHA supplementatie

bleek het referentiegeheugen in jonge ratten te verbeteren, maar niet het werkgeheugen (Gamoh et al., 1999). De effecten van DHA op cognitief gedrag worden waarschijnlijk veroorzaakt door een veranderd dopamine metabolisme (Ng and Innis, 2003). Naast effecten op het leervermogen en geheugen zijn er onder andere ook effecten van een n-3 tekort gevonden op exploratief gedrag in een nieuwe omgeving (een lage opname van n-3, specifiek tijdens ontwikkeling leidt tot minder exploratie in een nieuwe omgeving; Enslen et al., 1991) en stressrespons (een n-3-rijk dieet vermindert geconditioneerde angst; Takeuchi et al., 2003). In resusapen bleek DHA stereotiep gedrag te verminderen (Reisbick et al., 1994) en in mensen bleek DHA de toename van agressie onder omstandigheden van mentale stress te voorkomen (Hamazaki et al., 1996). Bovendien hebben n-3 vetzuren invloed op immuuncellen en zijn er aanwijzingen voor anti-inflammatoire eigenschappen.

Bij de samenstelling van zeugenvoeders wordt er nauwelijks aandacht besteedt aan het effect ervan op de neurale ontwikkeling en het gedrag van de biggen. Voeders zijn gebaseerd op granen, die geen n-3 vetzuren bevatten. Als voeders voor drachtige en lacterende zeugen voldoende n-3 vetzuren zouden bevatten, zouden de biggen een beter ontwikkeld neurale systeem kunnen hebben, wat resulteert in een beter leer- en adaptatievermogen. Dit kan vervolgens leiden tot een betere voeropname (de voerbak wordt eerder gevonden en de betekenis ervan wordt eerder begrepen) en een betere groei. Het leervermogen zou een indicator kunnen zijn voor de neurale ontwikkeling. Het gedrag en de (stress)respons van biggen op uitdagende omstandigheden (spenen) is indicatief voor het adaptatievermogen, dat als gevolg van een suboptimale neurale ontwikkeling aangetast kan zijn. Hier is nauwelijks onderzoek naar gedaan in varkens. Doel van dit project is de effecten van verstrekking van n-3 vetzuren (DHA) aan de zeug tijdens de late dracht en de lactatie op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen te onderzoeken, en de sickness response.

Literatuur

Bourre, J.-M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880-1892.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 1221-1229.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leung, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980b. Extrauterine fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4, 131-138.

Enslen, M., Milon, H., Malnoë, A., 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development of brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* 26, 203-208.

Gamoh, S., Hashimoto, M., Sugioka, K., Shahdat Hossain, M., Hata, N., Misawa, Y., Masumura, S., 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93, 237-241.

Hamazaki, T., Sawazaki, Sh, Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M., 1996. The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults; a placebo-controlled double-blind study. *J. Clin. Invest.* 97, 1129-1133.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22, 474-480.

Lamprey, M.S., Walker, B.L., 1978. Learning behaviour and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth. *J. Nutr.* 108, 358-367.

Morgan, B.L.G., Oppenheimer, J., Winick, M., 1981. Effects of essential fatty acid deficiency during late gestation on brain N-acetylneuraminic acid metabolism and behaviour in the progeny. *Br. J. Nutr.* 46, 223-230.

Ng, K.-F., Innis, S.M., 2003. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid. *J. Nutr.*, 133, 3222-3227.

Passingham, R.E., 1995. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav. Evol.* 26, 167-175.

Reisbick, S., Neuringer, M., Hasnain, R., Connor, W.E., 1994. Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids. *Physiol. Behav.* 55, 231-239.

Rooke, J.A., Sinclair, A.G., Edwards, S.A., 2001. Feeding tuna oil to the sow at different times during pregnancy has different effects on piglet long-chain polyunsaturated fatty acid composition at birth and subsequent growth. *Br. J. Nutr.* 86, 21-30.

Sweasy, D., Patterson, D.S.P., Glancy E.M., 1976. Biphasic myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. *J. Neurochem.* 27, 375-380.

Takeuchi, T., Fukumoto, Y., Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131, 193-203.

Takeuchi, T., Iwanaga, M., Harada, E., 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* 964, 136-143.

1.b. Het uiteindelijke doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

In de maatschappij zijn er zorgen over het welzijn van dieren in de intensieve houderij. Deze proef levert een bijdrage aan het verbeteren van het welzijn van biggen.

De voeding van zeugen bevat nauwelijks n-3 vetzuren, waarvan in studies met ratten en mensen is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de neurale ontwikkeling van hun nakomelingen. Dit zou een belangrijke reden kunnen zijn voor het beperkte adaptatievermogen van biggen aan de uitdagende en stressvolle situaties die zich voordoen in hun vroege leven. De beperkte adaptatie resulteert in veel welzijns- en gezondheidsproblemen. Het uiteindelijke doel is met de voersamenstelling voor de zeug rekening te houden met de behoefte voor optimale ontwikkeling van de biggen, zodat het aanpassingsvermogen en daardoor ook het welzijn van de biggen verbeterd wordt. Een beter adaptatievermogen, bijvoorbeeld aan de omschakeling van melk naar vast (spoon)voer zorgt ook voor een betere (darm)gezondheid van de big en minder uitval. Daarom is er naast een beter welzijn van de biggen ook sprake van een economisch voordeel.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 16-02-2008 tot 23-04-2008

3. Specificatie diergroepen:

n-3 rijk zeug	14	varkens	Zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm zeug	14	varkens	Zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big	24	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer
n-3 arm big	24	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer
n-3 rijk big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
n-3 arm big hersenen	12	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer die gebruikt worden voor hersenanalyse
zeug	2	varkens	reservedieren voor tweede ronde

n-3 rijk big	6	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer; challenge fys. zout
n-3 rijk big	18	varkens	Biggen van zeugen op n-3 rijk voer; LPS challenge
n-3 arm big	6	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer; challenge fys. zout
n-3 arm big	18	varkens	Biggen van zeugen op n-3 arm voer; LPS challenge

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

De aantallen dieren betreffen de aantallen voor het gehele experiment (ronde 1 en ronde 2). De eerste ronde van het experiment is reeds uitgevoerd in 2005 volgens planning (met n=14 zeugen en n=54 biggen). De planning was destijds om dezelfde 14 zeugen te herinsemineren voor de tweede ronde. Omdat de tweede ronde van het experiment wegens omstandigheden pas in 2007-2008 wordt uitgevoerd (hierover is in 2005 en ook recent met de DEC gecorrespondeerd), worden er nieuwe zeugen aangekocht.

In de tweede ronde worden 14 zeugen gebruikt, waarvan tot aan werpen twee reservedieren (een op n-3 arm en een op n-3 rijk voer). Om 14 drachtige zeugen te verkrijgen, worden 16 zeugen aangekocht en geïnsemineerd (twee reserve zeugen indien niet alle zeugen drachtig worden). Uiteindelijk worden van n=12 tomen biggen blootgesteld aan de proefbehandelingen. Voor het spenen wordt het gedrag van alle biggen geobserveerd. Eén big per worp wordt opgeofferd voor het spenen (zie proefbehandelingen). Voor de metingen na het spenen worden er acht biggen per worp gebruikt. Eventuele overige biggen worden aangehouden als reservebiggen. In principe worden er per proefbehandeling dus $9 \times 2 \times 6 = 108$ biggen gebruikt voor 2 rondes, voor deze 2e ronde dus 54 per proefbehandeling. Voor de inschatting van het totaal aantal biggen is een gemiddelde van 10 biggen per worp aangehouden (dus in totaal 120 biggen per proefbehandeling, waarvan 12 dieren worden opgeofferd).

Wijziging t.o.v. het oorspronkelijke protocol in 2005 is dus de aankoop van 14 zeugen die op proefvoer worden gezet (i.p.v. hergebruik 14 zeugen) plus 2 reservezeugen voor inseminatie (om 14 drachtige zeugen te verkrijgen). De proefbehandeling van de biggen is niet gewijzigd t.o.v. het oorspronkelijke, door de DEC reeds goedgekeurde, protocol.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Het betreft onderzoek om het aanpassingsvermogen en daarmee ook het welzijn van varkens te verbeteren. Het varken is dus het doeldier.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Omdat de invloed van voeding van de zeug op het gedrag en leervermogen van de biggen wordt onderzocht is de zeug de experimentele eenheid. Voor de hele proef geldt n=12 per proefbehandeling; voor de 2e ronde dus n=6 per behandeling. Met n=12 is het mogelijk verschillen in DHA in de hersenen van de biggen aan te tonen. Dit blijkt uit verschillen in gemiddelde DHA-concentraties tussen twee proefbehandelingen (tonijnolie versus sojaolie) en de individuele variatie in studies van Rooke et al. (1998, 1999). In deze studies werd de aanzet van vetzuren (m.n. DHA) in diverse weefsels (ook hersenen) van jonge biggen, als gevolg van tonijnolie (vergelijkbare hoeveelheden als in de huidige proef) in het voer van de zeugen gemeten. Voor de holeboardtest is dit aantal ook nodig om voldoende contrast aan te tonen. Dit is gebaseerd op eerdere studies binnen de leerstoel [REDACTED] (o.a. [REDACTED]). Het benodigde aantal is niet exact te bepalen, omdat in de voorgaande studies het effect van heel andere factoren (huisvesting, stress) op het leervermogen en geheugen is getest.

We hebben van 6 dieren per voerbehandeling (DHA of niet) bloedmonsters nodig per tijdstip (voor elk van 3 tijdstippen na injectie, omdat de verschillende pro-inflammatoire cytokines een piek vertonen op verschillende tijdstippen na LPS challenge), dus n=18 per behandeling. Van de met fysiologisch zout injecteerde dieren willen we 2 bloedmonsters per tijdstip per voerbehandeling, alleen om te checken of er niet onverhoopt een respons op fysiologisch zout optreedt, dus n=6 per behandeling. Binnen een hok (n=6 hokken per voerbehandeling) worden dus 3 dieren gechallengeerd met LPS, en 1 met fysiologisch zout. Voor de temperatuur- en cortisolbepalingen willen we alle dieren binnen een hok samplen op elk tijdstip (n=18 per behandeling) omdat de variatie in deze bepalingen naar verwachting groot is. De aantallen zijn gebaseerd op De Groot et al. 2007 die met vergelijkbare aantallen effecten vond van prenatale stress (cortisolbehandeling van de zeug) op de gedrag en temperatuur na LPS challenge. Ook

hier geldt dat het benodigde aantal niet exact te bepalen is, omdat ik voorgaande studies effecten van heel andere factoren op de sickness response is bepaald.

Literatuur

Leliveld, L., 2004. The effect of an acute stressor on spatial learning and memory in pigs. MSc Thesis Ethology, Wageningen University.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1998. Effect of feeding tuna oil or soyabean oil as supplements to sows in late pregnancy on piglet tissue composition and viability. Br. J. Nutr. 80, 273-280.

Rooke, J.A., Bland, I.M., Edwards, S.A., 1999. Relationships between fatty acid status of sow plasma and that of umbilical cord, plasma and tissues of newborn piglets when sows were fed on diets containing tuna oil or soyabean oil in late pregnancy. Br. J. Nutr. 82, 213-221.

4.d. Herkomst:

n-3 rijk zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big hersenen	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
zeug	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 rijk big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland
n-3 arm big	A. van gereg. fok/toeleveringsbedrijf in Nederland

Toelichting:

Afkomstig van gangbaar, door [REDACTED] veel gebruikt toeleverbedrijf.

5.a. Accommodatie:

Zeugen worden tijdens de dracht gehuisvest in voerligboxen om individueel voer te kunnen verstrekken en tijdens de lactatie (ook de laatste dagen van de dracht) in standaard kraamhokken. Na het spenen worden de biggen in groepen van vier gehuisvest in hokken van ongeveer 4 m².

5.b. Huisvesting & Verzorging:

De varkens worden volgens de normale procedure verzorgd (dagelijkse gezondheidscontrole). Bij gezondheidsproblemen wordt met de onderzoekers overlegd, alvorens tot behandeling wordt overgegaan.

5.c. Voeding:

De voersamenstelling is als omschreven bij de proefbehandelingen. Tijdens de dracht worden zeugen tweemaal per dag gevoerd volgens een oplopend schema (volgens centraal veevoederbureau, rekening houdend met het gewicht van de zeugen). Het eerste deel van de dracht (60 d) krijgen ze een standaard voer voor drachtige zeugen, het laatste deel van de dracht en tijdens de lactatie een proefvoer. De zeugen worden gewend aan het proefvoer, door het gedurende zes dagen te mengen met voer dat ze tot dan toe kregen (2 dagen 25%, 2 dagen 50% en 2 dagen 75% proefvoer; dag 60-65). Na het spenen krijgen de biggen toegang tot een standaard speenvoer. Tijdens de lactatie worden de biggen niet bijgevoerd.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

De zeugen worden opgesplitst in twee proefbehandelingen. Deze twee proefbehandelingen zijn verschillende vetbronnen in het voer (laatste trimester van de dracht en tijdens de lactatie). Het proefvoer bestaat uit een vetarm basisvoer, dat voor beide proefgroepen gelijk is met een toevoeging van zonnebloemolie of een visolie als vetbron. Visolie is rijk, en zonnebloemolie arm aan n-3 vetzuren (m.n.

docosahexaeenzuur). Het voer wordt verstrekt als een droog mengvoer. De samenstelling van het basisvoer voor de dracht en de lactatie is verschillend, vanwege verschillende behoefte van de zeug en de biggen in beide periodes. De proefvoerders worden geanalyseerd op hun samenstelling (incl. vetzuursamenstelling).

Om de ontwikkeling van het lichaamsgewicht en de spekdikte tijdens de dracht en de lactatie te volgen worden zeugen gewogen en wordt spekdikte gemeten 1-2 weken na inseminatie, bij de start van de proefbehandelingen, bij de verplaatsing naar de kraamstal en na het spenen. Bij de start van de proefbehandelingen en bij de verplaatsing naar de kraamstal wordt er bloed bemonsterd van de zeugen via punctie van de vena Jugularis. Een week na het werpen wordt er melk bemonsterd na een intramusculaire injectie met oxytocine. Bloedplasma en melk worden bij -20 gr. C opgeslagen tot analyse van de vetzuursamenstelling.

De exacte draagtijd van de zeug wordt geregistreerd evenals het aantal levend en dood geboren biggen en het geboortegewicht. Van elke big wordt geregistreerd hoe snel het dier een speen bereikt en succesvol drinkt. Er wordt ook geregistreerd hoe snel elk dier voor het eerst op de pootjes staat. Dit zijn indicatoren voor de vitaliteit van de big. Wekelijks wordt de ontwikkeling van het gewicht van de biggen bijgehouden, zowel voor als na het spenen. Tijdens de lactatie wordt verschillende keren het gedrag van de biggen geobserveerd, zowel tijdens het zogen als tussen zoogbeurten, volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag. Een week na het werpen wordt er een melkmonster genomen na injectie met oxytocine (10 IU/ml, 1 ml i.m.).

Eén big per worp wordt opgeofferd (voor elke behandeling evenveel mannelijke als vrouwelijke dieren). Onder anaesthesie (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) wordt een bloedmonster genomen uit het hart via punctie. Daarna worden de dieren geëuthanaseerd (T61, i.c.) en worden de hersenen verwijderd. Deze worden, evenals het bloedplasma, bij -20 gr. C bewaard tot analyse van de vetzuursamenstelling. De overige dieren worden op 28 d gespeend. Vier biggen per worp worden samen in een groep gehuisvest (niet mengen). Hierbij wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze dieren worden gebruikt voor de holeboard test (zie hieronder). Vier andere biggen per worp worden elk met drie onbekende biggen van andere zeugen op dezelfde voerbehandeling gemengd (groep is de experimentele eenheid). Ook hier wordt gestreefd naar een gelijke verdeling van mannelijke en vrouwelijke biggen. Deze biggen worden gebruikt voor gedragsobservatie en bepaling van de voeropname (zie hieronder). Alle biggen krijgen onbeperkt toegang tot een standaard speenvoer en kunnen tegelijk vreten. Eventuele overige toomgenoten (random bepaald) worden niet verder gebruikt in de proef.

Van de gemengde dieren wordt na het spenen het tijdstip van het eerste bezoek aan de voerbak (hoofd in de voerbak) en van de eerste voeropname geregistreerd (hoofd in de voerbak gedurende minimaal x seconden). De voeropname wordt per hok dagelijks gemeten. Frequenties en uren van voeropname worden op enkele dagen geregistreerd. Voor de observaties aan voeropname worden video-opnamen gemaakt gedurende de eerste week na het spenen. Verschillende keren wordt het gedrag direct geobserveerd volgens een van tevoren vastgesteld ethogram. Hierbij wordt met name gelet op agonistisch gedrag, maar ook bijv. op spelgedrag.

Van deze gemengde dieren zullen op 11-12 weken leeftijd 36 dieren (18 DHA-groep, 18 controlegroep) blootgesteld worden aan een niet-infectieuze milde immuunchallenge met LPS (2 microgram per kg lichaamsgewicht, i.v. in 200 microliter fysiologisch zout). De verwachting is dat de immuun- en gedragsparameters 12 uur na blootstelling weer op basaal niveau zijn; er kan een koortsreactie optreden die na max 8 uur verdwenen is (dit gebaseerd op een vergelijkbare proef door De Groot et al. 1997, *Physiol & Behav* 90:612-618) waarin dieren van vergelijkbare leeftijd/ras werden gebruikt). Twaalf andere dieren (6 DHA-groep, 6 controlegroep) krijgen een injectie met fysiologisch zout ter controle (ook i.v., 200 microliter). Alle dieren worden op de dag van en de dag voor de challenge getemperatuurd (rectaal en oor) en speekselmonsters voor cortisolbepaling worden genomen voor bepaling van basaalwaarden, op dezelfde tijdstippen als op de dag van challenge (op t=-1 uur, 1, 3, 6 en 8 uur na challenge). Verder wordt nog eenmaal op de dag na challenge een speekselmonster genomen + getemperatuurd. Een human approach test wordt uitgevoerd en de tijd tot aanraken van een bekende persoon die het hok binnenstapt

wordt bepaald als indicatie van de gedragsmatige sicknessrespons (controledieren komen snel op een bekende persoon af, dieren met een sickness response niet, zie ook De Groot et al. 2007). Deze test wordt uitgevoerd op de dag voor challenge eenmaal, en op t=-1 uur, 1, 3, 6, 8 uur na challenge en eenmaal op de dag erna, en zal worden gecombineerd met het nemen van speekselmonsters (getrainde varkens kauwen graag op wattenstaafjes). Bloed voor bepaling van pro-inflammatoire cytokines IL-1, IL-6, en TNF- α wordt eenmaal afgenomen van alle dieren op de dag voor challenge, en eenmaal op de dag van challenge, waarbij dieren worden verdeeld over de tijdstippen t=1, 3 en 6 uur na challenge.

De dieren die niet gemengd zijn ondergaan individueel een zogenaamde holeboard test om het ruimtelijk leervermogen en geheugen te testen. Het 'holeboard' bestaat uit een testruimte, waarin 16 emmers staan opgesteld. In deze emmers kan een beloning (bijv. rozijntje) worden aangeboden. Na uitgebreide gewenning aan de testprocedure ondergaan de biggen verschillende malen de werkelijke test. In deze test wordt in vier van de 16 emmers een beloning aangeboden. Het aantal fouten dat een dier maakt wordt geregistreerd, evenals de tijd die nodig was om alle beloningen te vinden. De complete procedure is beschreven in diverse MSc verslagen (o.a. [REDACTED]). Er worden enkele aanpassingen gemaakt, ter verbetering van deze procedure.

6.b. Mate van ongerief:

n-3 rijk zeug	B. Gering/Matig
n-3 arm zeug	B. Gering/Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 rijk big hersenen	C. Matig
n-3 arm big hersenen	C. Matig
zeug	A. Gering
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 rijk big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig
n-3 arm big	C. Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Zeugen: Tweemaal per dracht wordt er bloed bemonsterd uit de vena Jugularis (punctie). Hierbij worden de dieren kort vastgebonden. Voor melkbemonstering worden de zeugen éénmaal met oxytocine behandeld (10 IU/ml, 1 ml i.m.). De proefbehandeling an sich veroorzaakt geen ongerief. De zeugen worden conform de praktijk gehouden en gevoerd. De voerverstrekking (het voer bevat de proeffactor) voldoet aan de wettelijke eisen en aanbevelingen van het centraal veevoederbureau. De zeugen worden individueel gehuisvest in voerligboxen om individueel te kunnen voeren. Dit beperkt de bewegingsvrijheid van de zeug en lichamelijk sociaal contact met soortgenoten, maar is nog wettelijk toegestaan.

Biggen: Eén big per worp (24 in totaal) wordt gedood om de hersenen te verwijderen. Omdat het gaat om jonge biggen (3-4 weken oud) worden de biggen eerst onder anaesthesie gebracht (Ketamine, 20 mg/kg + Xylazine, 2 mg/kg; i.m.) alvorens T61 wordt toegediend. Voor het toedienen van T61 wordt er eerst een bloedmonster genomen uit het hart.

Vier biggen per worp worden gemengd met onbekende soortgenoten, wat sociale stress oplevert. Dit is conform de praktijk. Ongerief t.g.v. de LPS-challenge bij deze dieren bestaat uit

- I.v. injectie (inclusief fixatie dieren)
- Bloedafname (op dag van injectie en de dag ervoor, aan 2 verschillende zijden)
- Sickness reactie op LPS (mogelijk koorts) voor n=36
- Mogelijk stress door meten lichaamstemperatuur

Vier andere biggen ondergaan ook een test om het leervermogen en geheugen te onderzoeken. Hiervoor worden de biggen regelmatig tijdelijk afgezonderd van de groep. Deze biggen worden enigszins beperkt in hun voeropname om de motivatie om de beloning in de test te zoeken te vergroten. Ze krijgen wel ruim voldoende voer voor onderhoud en groei.

Algemene toelichting:

Om de proeffactor te controleren is het minimaal nodig van het voer van de zeugen en van de hersenen van de biggen (het gaat om neurale ontwikkeling) de vetzuursamenstelling te bepalen. Omdat er plannen zijn voor vervolgonderzoek met andere vetzuren (precursors voor DHA synthese door de zeug) worden tevens bloed- en melkmonsters van de zeugen genomen om de vetzuursamenstelling te bepalen. Dit gebeurt om de studies met elkaar te kunnen vergelijken. De vetzuursamenstelling van het bloed van de zeugen bepaald wat de ongeboren biggen tot zich krijgen en de vetzuursamenstelling van de melk bepaald wat de pasgeboren biggen tot zich krijgen. Het is interessant om dus ook van het bloed en de melk van de zeugen de vetzuursamenstelling te weten. Dit zijn tevens extra controlestappen voor de huidige studie en zouden verklarend kunnen zijn voor de samenstelling die in de hersenen wordt gevonden. Omdat de biggen toch onder anaesthesie moeten alvorens euthanasie wordt toegepast is het voor de dieren niet extra ingrijpend om onder anaesthesie een bloedmonster te nemen. Deze monsters worden bewaard voor eventuele vetzuuranalyse.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| n-3 rijk zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm zeug | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 arm big | A. Niet toegepast (geen aanleiding). |
| n-3 rijk big hersenen | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big hersenen | D. Is wel toegepast. |
| zeug | D. Is wel toegepast. |
| n-3 rijk big | D. Is wel toegepast. |
| n-3 rijk big | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big | D. Is wel toegepast. |
| n-3 arm big | D. Is wel toegepast. |

Pijnbestrijding:

- | | |
|-----------------------|--|
| n-3 rijk zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big hersenen | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| zeug | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 rijk big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |
| n-3 arm big | A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat. |

De bloedbemonstering via punctie is beperkt tot tweemaal voor de zeugen (controle bij aanvang van de proefbehandeling en voor de partus) en de melkbemonstering na oxytocine-behandeling tot éénmaal. Het ongerief bij de biggen die gedood worden wordt beperkt door ze voorafgaand aan de toediening van T61 onder anaesthesie te brengen. Dit gebeurt intramusculair, wat voor jonge beweeglijke biggen aan te raden is (pers. comm. [redacted]). Voor de keuze van de anaesthetica is ook advies ingewonnen van deze personen. [redacted] (art. 12) zal de anaesthesie en euthanasie uitvoeren. Zij is zeer bekwaam in deze handelingen.

De biggen die worden blootgesteld aan LPS-challenge laten we wennen aan de mensen die handelingen uitvoeren, waardoor stress door fixatie en temperaturen zo laag mogelijk zijn. Verder wordt er geoefend

met het nemen van speekselmonsters zodat dit geen stress oplevert

We hebben gekozen voor een niet-infectieuze, milde en kortdurende (reacties naar verwachting max. 8-12 uur) LPS-challenge. De dosis is dusdanig gekozen dat er een immuun- en gedragsreactie optreedt, maar dat dieren niet echt heel ziek worden of moeten overgeven, en is ca. 50 x lager dan in vergelijkbare experimenten gebruikelijk is.

De biggen die gebruikt worden voor de holeboard test worden gewend aan hantering door mensen en afzondering van de groep, waardoor het ongerief door afzondering tijdens de test wordt beperkt. In de leertest wordt gebruik gemaakt van beloningen in plaats van straffen, waardoor kan worden aangenomen dat de test door de biggen als plezierig wordt ervaren.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

n-3 rijk zeug	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm zeug	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm big	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big hersenen	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
n-3 arm big hersenen	Het dier is gestorven of gedood ter beëindiging van de proef.
zeug	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 rijk big	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm big	Het dier is na de proef in leven gelaten.
n-3 arm big	Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

De zeugen kunnen worden gebruikt voor andere proeven. Een selectie van biggen (24) wordt gedood in de proef. Overige biggen kunnen worden gebruikt voor andere proeven of worden afgevoerd voor afmesting op een commercieel bedrijf.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Het varken is het doeldier in deze proef. Daarom kan er geen gebruik gemaakt worden van andere diersoorten of een proef zonder dieren. Er is advies ingewonnen van deskundigen van [REDACTED] m.b.t. anaesthesie en euthanasie van de selectie biggen. De methode die is gekozen, veroorzaakt minimaal ongerief voor de biggen. De holeboard test voor leervermogen en geheugen is in de afgelopen jaren in diverse proeven bij de leerstoel [REDACTED] gebruikt. Aanbevelingen voor verbetering van deze methode in rapportages van deze proeven hebben geleid tot steeds verdere verfijning van de test. Het aantal te gebruiken dieren is zodanig gekozen, dat met een minimaal aantal dieren toch voldoende contrast in de effecten van de proefbehandelingen kan worden aangetoond. Hiervoor is relevante literatuur geraadpleegd (zie toelichting voor het aantal gebruikte dieren).

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Diverse studenten [REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2005015.g (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
n-3 rijk zeug	1	42	1	14					01	1	1	2	3
n-3 arm zeug	1	42	1	14					01	1	1	2	3
n-3 rijk big	1	42	1	24					01	1	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	24					01	1	1	3	3
n-3 rijk big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
n-3 arm big hersenen	1	42	1	12					01	4	1	3	1
zeug	1	42	1	2					01	4	1	1	3
n-3 rijk big	1	42	1	6					01	4	1	3	3
n-3 rijk big	1	42	1	18					01	4	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	6					01	4	1	3	3
n-3 arm big	1	42	1	18					01	4	1	3	3

Uw aanvraag 2005015.a (Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen), door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Te wijzigen' gekregen.

De DEC heeft de volgende vragen en opmerkingen:

De DEC verzoekt u vraag 9 (alternatieven) volledig in te vullen.

Daarnaast verzoekt de DEC u de mate van ongerief te wijzigen in "matig" in verband met het wekelijks wegen.

Bovendien verzoekt de DEC u de diergroepen te splitsen en bij 8 (toestand dieren na einde van de proef) en in de registratiecodetabel correct te vermelden welke dieren gedood worden in het kader van de proef.

Tenslotte verzoekt de DEC u aan te geven, wie de hartpunctie uitvoert, aangezien deze handeling een zeer specifieke vaardigheid vergt.

Uw antwoorden zullen door het klein comité worden besproken en afgehandeld.

Uw aanvraag 2005015.b (Effect van maternale opname van docosahexaeenzuur (DHA) op het gedrag, het leervermogen en de groei van de biggen), door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2005015.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies heeft de DEC de volgende vragen en opmerkingen:

De DEC verzoekt u middels een amendement in het nieuwe proefplan duidelijker aan te geven, welk deel van de proef nu uitgevoerd wordt, aangezien nu de suggestie wordt gewekt, dat de hele proef opnieuw wordt uitgevoerd. Bovendien verzoekt de DEC in het proefplan duidelijker aan te geven, hoeveel dieren er voor het uit te voeren gedeelte worden gebruikt. Tenslotte verzoekt de DEC u nog in het amendement aan te geven of de eerste ronde wel of niet tot gewijzigde inzichten heeft geleid waardoor de opzet van de tweede ronde wel of juist niet gewijzigd wordt t.o.v. de eerste ronde.

Na beantwoording zal de proef door de secretaris van de DEC worden afgehandeld

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2005015.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2005015.e, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2005015.f, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan. Voorafgaand aan een definitief advies heeft de DEC de volgende vragen:

De DEC verzoekt u het aantal biggen dat wordt gechallengeed te beargumenteren (2x18) en als aparte groepen te onderscheiden bij 3. (specificatie diergroepen), 4. d. (herkomst) en (6.b. (mate van ongerief) en 7 (maatregelen ter beperking van ongerief).

Tevens verzoekt de DEC u te verduidelijken, waarom voor de LPS-challenge is gekozen voor een leeftijd van 11-12 weken (is dit een zinvolle leeftijd voor de LPS-challenge of is deze leeftijd gekozen omdat dan alle andere testen afgelopen zijn?).

Uw antwoorden zullen door de secretaris van de DEC worden afgehandeld.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2005015.g, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Met vriendelijke groet,


Proefdierdeskundige