



**Empfehlung der ZKBS
von Qualitätskriterien an ein Versuchsdesign
für Fütterungsstudien an Mastschweinen
mit gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial**

Die Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) und deren Verwendung in Lebens- und Futtermitteln erfolgt in der Europäischen Union (EU) fallspezifisch für den jeweils in Frage stehenden GMO. Die zuständige Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) folgt bei der Risikobewertung einem ganzheitlichen Ansatz, der auf einer Gesamtbetrachtung aller erforderlichen Daten beruht und damit eine abschließende Bewertung erlaubt (EFSA, 2011). Da es sich bei der Sicherheitsbewertung von GMO immer um eine Einzelfallprüfung handelt, entscheidet die EFSA von Fall zu Fall, welche Untersuchungen hierzu erforderlich sind. Entsprechend wird auch jeweils im Einzelfall entschieden, ob die Durchführung einer Fütterungsstudie an Schweinen oder anderen Zieltierarten notwendig ist, um die Risikobewertung für den in Frage stehenden GMO vollständig abschließen zu können. Studien mit Schweinen oder anderen Zieltierarten wären dann sinnvoll, wenn vorausgegangene Studien Indizien dafür ergeben hätten, dass das Testmaterial bestimmte gesundheitliche und/oder ernährungsphysiologisch relevante Effekte verursacht bzw. verursachen könnte. Dann könnten genau die Endpunkte, die mit den zuvor ermittelten oder vermuteten gesundheitlichen bzw. ernährungsphysiologischen Effekten in Verbindung stehen, in einer nachfolgenden und für die entsprechende(n) Fragestellung(en) geeigneten Fütterungsstudie untersucht werden.

Die ZKBS hält die bestehenden Anforderungen an die Sicherheitsbewertung für das Inverkehrbringen gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel in der EU nach derzeitigem Stand von Wissenschaft und Technik für ausreichend. Eine obligatorische Durchführung von Fütterungsstudien an Schweinen oder anderen Zieltierarten im Rahmen des europäischen Zulassungsverfahrens gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel hält die ZKBS ebenso wie die EFSA nicht für erforderlich.

Die ZKBS weist auch darauf hin, dass der Erkenntnisgewinn von Fütterungsstudien mit gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial für die Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel begrenzt ist. Pflanzenmaterial bzw. daraus hergestellte Le-

bens-/Futtermittel bestehen aus einer Vielzahl von Einzelsubstanzen und weisen somit eine komplexe Zusammensetzung auf. Aufgrund der Natur von Lebens- und Futtermitteln (großes Volumen und damit Limitierung einer Verabreichung durch Erreichen der Sättigung) können diese im Vergleich zu Einzelsubstanzen (z. B. Chemikalien) nur in einem geringeren Vielfachen der erwarteten menschlichen Exposition verabreicht werden. Dadurch kann nur ein mäßiger Sicherheitsspielraum (*Margin of Safety*) erreicht werden. Die Höhe der verabreichbaren Dosis von Ganzpflanzenmaterial oder Material aus einer einzigen Pflanzenart ist auch dadurch limitiert, dass eine unausgewogene Zusammensetzung des Futters vermieden werden muss, da es sonst zu einem Ernährungsungleichgewicht kommen kann.

Gleichwohl kann es im Einzelfall durchaus geboten sein, eine Fütterungsstudie mit Mastschweinen durchzuführen, um bestimmte Fragen zu beantworten, die für die Risikobewertung eines konkreten GVO relevant sein können. Für einen solchen Fall empfiehlt die ZKBS, die folgenden Qualitätskriterien an ein Versuchsdesign zu beachten.

1. Allgemeine Versuchsanforderungen

- Wahl und Charakterisierung der Versuchstiere

Es existieren viele verschiedene Schweinerassen, von denen jedoch nur wenige maßgeblich in der Produktion von Schweinefleisch verwendet werden. In der Schweinemast werden vornehmlich Kreuzungen verschiedener Zuchtlinien innerhalb einer Rasse und Kreuzungen verschiedener Rassen eingesetzt. Die Wahl einer bestimmten Schweinerasse bzw. Kreuzung soll im Versuchsdesign begründet werden.

Um zu gewährleisten, dass alle Tiere vor Versuchsbeginn gleichen Haltungsbedingungen ausgesetzt waren, sollen alle Ferkel vom selben Züchter bezogen oder selbst produziert werden. Es muss sichergestellt sein, dass alle Schweine vor Versuchsbeginn gleich behandelt wurden (z. B. Zähne abschleifen, Schwanz kupieren, etc.). Es wird empfohlen, dass die Muttertiere sowohl vor und während der Trächtigkeit als auch während der Säugephase nicht mit gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial gefüttert werden. Die Versuchstiere sollen alters- und gewichtsmäßig aufeinander abgestimmt sein. Sie sollen gesund und bisher noch in keinem Versuch eingesetzt worden sein. Bei weiblichen Tieren ist darauf zu achten, dass es sich um Nullipara handelt, die nicht trächtig sind.

Die Versuchstiere sind nach Rasse bzw. Kreuzung, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und Alter zu charakterisieren. Bei Studienbeginn soll die Körpergewichtsvariation 10 % des mittleren Gewichtes aller Tiere eines Geschlechtes nicht übersteigen. Jedes Versuchsschwein soll mit einer eindeutigen Kennung/Identifikationsnummer markiert werden.

- **Haltungsbedingungen**

Hinsichtlich der Ansprüche an geeignete Haltungsbedingungen für Schweine wird auf die entsprechenden Angaben im Tierschutzgesetz (TierSchG), der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (TierSchNutztV) und der Schweinehaltungshygieneverordnung (SchHaltHygV) verwiesen.

Umgebungstemperatur (für Mastschweine gilt ein Temperaturoptimum von 15 bis 18 °C) und relative Luftfeuchtigkeit (Luftfeuchtigkeitsgehalt von 70 % ist für Schweine optimal) müssen während der gesamten Studie überwacht werden. Ein Tag-Nacht-Zyklus ist einzuhalten.

Da Schweine sozial lebende Tiere sind, wird die Gruppenhaltung von Tieren eines Geschlechts gegenüber einer Einzelhaltung empfohlen. Auch in der kommerziellen Haltung von Mastschweinen werden die Tiere in Gruppen gehalten. Da Wechselwirkungen zwischen dem Untersuchungsgegenstand und der Haltungsform nicht auszuschließen sind, empfiehlt sich eine Versuchsdurchführung unter den Bedingungen einer Gruppenhaltung, um einen möglichst realistischen Bezug zur Praxis zu gewährleisten. Gleichwohl kann auch eine Einzelhaltung für bestimmte Fragestellungen sinnvoll sein und wäre in einem solchem Fall fachlich zu begründen.

- **Fütterung**

Futter und Wasser müssen über die gesamte Versuchsdauer regelmäßig auf ihren Gehalt an Schadstoffen wie Pestizidrückstände, persistente organische Verunreinigungen, Phytoöstrogene bzw. Hormonvorstufen, Schwermetalle und Mykotoxine, untersucht werden. Die Diäten müssen dem geschlechts- und altersspezifischen Energie- und Nährstoffbedarf von Schweinen gerecht werden und bis zum Ende der Fütterung in regelmäßigen Abständen auf ihren Nährstoffgehalt überprüft werden.

Neben proteinreichen Konzentratfuttermitteln bildet Getreide wie Weizen, Mais und Gerste, einen wesentlichen Bestandteil von Schweinerationen. Aufgrund seines hohen Energiegehaltes und der guten Verdaulichkeit ist Mais derzeit ein wichtiges Futtermittel in der Schweinefütterung. In einer ausgewogenen Futtermischung kann der Maisanteil bei Beachtung aller übrigen Erfordernisse bis zu 60 % ausmachen. Ein häufig in der Schweinemast eingesetztes Maisprodukt ist der Corn-Cob-Mix (CCM). Hierbei handelt es sich um eine aus der Spindel und den Körnern des Maiskolbens bestehende Sonderform des Maiskolbenschrots. CCM kann als vollwertiges Grundfutter mit hohem Energiegehalt in der Schweinemast eingesetzt werden.

Da ein hoher Proteinansatz das primäre Ziel der Schweinemast ist, gelten hohe Anforderungen an die Menge und Qualität des Proteins im Futter. Als Eiweißfutter kommt in der

Schweinemast hauptsächlich Sojaextraktionsschrot zum Einsatz, da dieses eine günstige Aminosäurezusammensetzung aufweist und eine geeignete Quelle für Lysin sowie weitere essentielle Aminosäuren ist.

Ergänzt werden übliche Mastschweinerationen mit Vormischungen, die der Ergänzung der Futtermittelration mit notwendigen Mengen- und Spurenelementen sowie Vitaminen dienen. Diese Vormischungen sind ein wichtiger Bestandteil in der Fütterung von Schweinen und sind mengenmäßig genau auf die jeweils in der Ration befindlichen Eiweiß- und Energiefuttermittel abzustimmen.

2. Spezielle Versuchsanforderungen

Zunächst weist die ZKBS darauf hin, dass die Ausgestaltung eines Versuchsdesigns im Einzelfall maßgeblich davon abhängt, mit welcher Sicherheit welche Aussagen im Rahmen des betreffenden Versuchsvorhabens getroffen werden sollen. Daher müssen die Ziele bzw. Fragestellungen, die mit der Durchführung der Studie erreicht bzw. abgeklärt werden sollen, klar beschrieben werden. Auf dieser Grundlage kann anschließend ein angemessenes Versuchsdesign mit hinreichend großer Aussagekraft konzipiert werden.

In diesem Zusammenhang wird darauf aufmerksam gemacht, dass je nach Fragestellung bzw. Zielvorgabe verschiedene einzelfallspezifische Versuchsdesigns möglich und sinnvoll sind. So ist es beispielsweise wichtig, im Vorfeld zu klären, ob es notwendig ist, die Studie so zu konzipieren, dass ihre Ergebnisse auf den Menschen oder andere Nutztiere übertragbar sind. Ein weiteres Beispiel ist die Frage, ob der toxikologische (Gesundheitseffekte) oder der ernährungsphysiologische Aspekt (Leistungsparameter) im Vordergrund der Studie stehen soll. Auch die Frage, ob die Studienergebnisse wenn irgend möglich Haltungsbedingungen in der konventionellen Schweinemast widerspiegeln sollen oder ob dies nicht wichtig ist, ist von Bedeutung. Auch ist im Vorhinein zu klären, wie wichtig Aussagen hinsichtlich bestimmter Einflussfaktoren (z. B. genetischer Hintergrund) sind. Dies sind nur einige der zahlreichen Aspekte, die Einfluss auf die Gestaltung eines Studiendesigns haben und deshalb fallspezifisch zu berücksichtigen sind.

- Erzeugung des zu Grunde liegenden Ganzpflanzenmaterials

Um etwaige Effekte tatsächlich eindeutig einer bestimmten Ursache, im vorliegenden Fall der Verfütterung von gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial, zuordnen zu können, ist es von zentraler Bedeutung, den Versuch so weit zu standardisieren, dass möglichst alle anderen Ursachen, die ebenfalls Auswirkungen auf die Gesundheit und/oder Mastleistung der Versuchstiere haben können, soweit vereinheitlicht bzw. ausgeschlossen sind, dass diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den Test- und Kontrollgruppen bestehen. Optimaler-

weise besteht der einzige Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe im vorliegenden Fall im GVO-Anteil des Futters. Alle anderen Versuchsparameter, einschließlich aller anderen Futterkomponenten (z. B. Nährstoffprofil, Pflanzenschutzmittelrückstände, Belastung mit Mykotoxinen), dürfen sich zwischen Test- und Kontrollgruppe nur so gering unterscheiden, dass eine Auswirkung auf das Ergebnis der Studie nicht zu erwarten ist. Herstellung und Charakterisierung des zu Grunde liegenden Ganzpflanzenmaterials sind somit von großer Bedeutung.

Test- und Kontrollpflanzen (in der Regel nah-isogene Kontrolle) müssen zeit- und ortsgleich unter standardisierten Bedingungen angebaut werden. Es wird empfohlen, dass sich die Herbizidbehandlung zwischen Test- und Kontrollpflanzen nicht unterscheidet.

Die ZKBS macht darauf aufmerksam, dass der Einsatz von Komplementärherbiziden (z. B. Glyphosat) beim Anbau gentechnisch veränderter herbizidtoleranter Pflanzen und die Effekte, die sich ggf. aus Rückständen von Pflanzenschutzmitteln und deren Metaboliten auf die Schweine ergeben, eine eigenständige Fragestellung ist, die bei Bedarf gesondert im Studiendesign zu berücksichtigen ist.

- Wahl und Charakterisierung des Ausgangspflanzenmaterials

Das Ausgangspflanzenmaterial, das für die Zubereitung der Versuchsdäten verwendet wird, sollte charakteristisch für das Produkt sein, das in der Schweinemast üblicherweise eingesetzt wird, z. B. CCM im Fall von Mais oder Sojaextraktionsschrot im Fall von Soja. Für den Fall, dass die Studienergebnisse auch Rückschlüsse auf den Menschen zulassen sollen, ist zu beachten, dass das Ausgangspflanzenmaterial, das für die Zubereitung der Schweinedäten verwendet wird, repräsentativ ist für das industriell verarbeitete Material, das in Produkten für den menschlichen Verzehr enthalten ist.

Die Inhaltsstoffzusammensetzung des Ausgangspflanzenmaterials ist umfassend zu analysieren. Dies gilt sowohl für das Test- als auch für das Kontrollmaterial. Zu erfassen sind Inhaltsstoffe wie Proximate (z. B. Wasser, Asche, Fasern), Hauptmakronährstoffe (z. B. Fette, Proteine, Kohlenhydrate), Hauptmikronährstoffe (z. B. Vitamine, Mineralstoffe), Antinutritiva, Toxine und ggf. bei bestimmten Fragestellungen Allergene. Diesbezüglich verweist die ZKBS auch auf die Empfehlungen in den Konsensdokumenten der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) zu Inhaltsstoffbetrachtungen für neue Sorten verschiedener Nutzpflanzen, darunter auch Mais und Soja (OECD, 2002 und OECD, 2012). Darüber hinaus sind auch Vorkommen und Gehalt natürlicherweise auftretender Kontaminationen (z. B. Mykotoxine) sowie von Rückständen, die auf bestimmten agronomischen Behandlungen (z. B. Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und deren Metaboliten) basieren, zu dokumentieren.

Das Test- und Kontrollmaterial ist mittels molekularbiologischer Methoden auf das Vorhandensein bzw. auf die Abwesenheit der gentechnischen Veränderung zu untersuchen. Wenn die gentechnische Veränderung der Pflanzen aus einem oder mehreren eingeführten Genen besteht, dann soll die Überprüfung der Expression des oder der Gene mit molekularbiologischen bzw. immunologischen Methoden im Testmaterial erfolgen.

- Herstellung, Analyse, Lagerung und Verabreichung der Diäten

Die Herstellung der Diäten soll nach praxisüblichen Bedingungen erfolgen und die gewählte Form der Futtevorlage (Trocken-, Brei- oder Flüssigfütterung) berücksichtigen. Mögliche Einflüsse des Verarbeitungsprozesses auf das in den Diäten enthaltene Pflanzenmaterial soll beachtet werden (z. B. hitzebedingte Denaturierung und/oder Degradation der in Folge der gentechnischen Veränderung neu exprimierten Proteine im Endprodukt).

Ebenso wie das Ausgangspflanzenmaterial sind auch die zubereiteten Diäten gründlich zu charakterisieren, indem die Inhaltsstoffzusammensetzung umfänglich analysiert wird. In diesem Zusammenhang sind auch die Gehalte möglicher Schadstoffe und Kontaminanten (z. B. persistente organische Verunreinigungen, Phytoöstrogene bzw. Hormonvorstufen, Schwermetalle und Mykotoxine) sowie Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und deren Metaboliten zu dokumentieren. Kontaminationen und Rückstände dürfen nicht über den zulässigen Höchstmengen liegen und sollten sich zwischen Test- und Kontrolldiäten nur insoweit unterscheiden, dass kein Einfluss auf die Studienergebnisse zu erwarten ist. Es ist darauf zu achten, dass alle Diäten isokalorisch sind und sich die Schweinerationen hinsichtlich ihrer Anforderungen an Energie-, Eiweiß- und Mineralfuttermittel nicht unterscheiden. Test- und Kontrolldiäten müssen standardisiert werden, so dass sie insoweit substantiell äquivalent sind, dass etwaige fütterungsbedingte Effekte auf die Schweine eindeutig auf die gentechnische Veränderung der zu testenden Futterkomponente zurückgeführt werden können. Insofern ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass sich alle anderen Futterparameter (z. B. Nährstoffe, Pflanzenschutzmittelrückstände, Mykotoxine) zwischen Test- und Kontrolldiät nur so gering unterscheiden, dass keine Auswirkung auf das Ergebnis der Studie zu erwarten ist.

Die Herstellung der Diäten hat unter Berücksichtigung der Richtlinien zur *Good Manufacturing Practice* (GMP) zu erfolgen. Um einen Verderb und Nährstoffverfall der Versuchsdiäten zu minimieren, sind des Weiteren angemessene Lagerbedingungen einzuhalten. Homogenität und Stabilität der Versuchsdiäten sollten unter Anwendungsbedingungen ermittelt und dokumentiert werden.

In der kommerziellen Schweinemast muss das gewählte Fütterungssystem dazu beitragen, dass die Tiere ihr Mastendgewicht möglichst schnell und stressfrei erlangen. Die ZKBS weist darauf hin, dass die unterschiedlichen Fütterungssysteme sowohl mit Vor- als auch mit

Nachteilen verbunden sind. Die Wahl der Futtevorlage richtet sich auch nach praktischen Gesichtspunkten, wie beispielsweise der Anzahl der Tiere pro Box, der Anzahl der Fressplätze pro Trog sowie Art und Zeitpunkt bzw. Zeitraum der Beobachtung/Kontrolle der Tiere durch den Menschen. Mitunter kann die Wahl der Futtevorlage auch den bereits existierenden örtlichen Gegebenheiten geschuldet sein (z. B. der Tatsache, welches Fütterungssystem in der Versuchseinrichtung bereits vorhanden und/oder etabliert ist). Die Wahl der Futtevorlage soll in jedem Fall fachlich begründet werden.

Das Futter kann den Schweinen rationiert oder frei verfügbar (*ad libitum*) vorgelegt werden. Während bei einer *ad libitum*-Fütterung ein Tier-Fressplatzverhältnis von 4:1 einzuhalten ist, muss bei einer rationierten Fütterung, bei denen die Tiere nur einmal täglich Futter erhalten, jedem Schwein ein Fressplatz zur Verfügung stehen. Bei einer tagesrationierten Fütterung (2-3 Fütterungen pro Tag) ist ein Fressplatz für zwei Tiere ausreichend. Die rationierte Fütterung mit einem Tier-Fressplatzverhältnis von 1:1 hat den Vorteil, dass sich zu den Fütterungszeiten alle Schweine am Trog befinden und somit gut beobachtet/kontrolliert werden können. Dadurch fallen kranke, lahme und zurückgebliebene Tiere eher auf, da sie z. B. nicht am Futtertrog stehen. Müssen sich hingegen, wie bei der *ad libitum*-Fütterung, mehrere Schweine einen Fressplatz teilen, hat dies zur Folge, dass nicht alle Tiere gleichzeitig fressen. Weil kranke und lahme Tiere hier nicht so leicht auffallen, stellt dies besondere Ansprüche an die Tierbeobachtung/-kontrolle. In jedem Fall sind die Ergebnisse der Tierbeobachtung/-kontrolle zu dokumentieren.

Die Fütterung selbst kann in Form einer Trocken-, Brei- oder Flüssigfütterung erfolgen. Eine einfache, kostengünstige und gut zu standardisierende Methode ist die Vorlage von trockenem Futter. Da im Futtertrog keine Getränkepipel installiert sind, müssen sich die Schweine separat an anderer Stelle mit Wasser versorgen. Als Vorteil der Trockenfütterung ist der geringe Managementaufwand im Hinblick auf die Futterhygiene zu nennen, wodurch eine Minimierung der sich über den zeitlichen Verlauf eventuell einstellenden Veränderungen sichergestellt werden kann. Bei der Breifütterung bzw. Trockenfütterung mit Wasser besteht für die Schweine die Möglichkeit, sich individuell zum vorgelegten Futter Wasser hinzu zu dosieren. Dadurch wird eine schnellere und bessere Futter- und Wasseraufnahme gewährleistet. Bei der Flüssigfütterung wird den Tieren direkt ein fertiges Gemisch aus Futter und Wasser angeboten. Die Anforderungen an die Futterhygiene sind bei dieser Art der Vorlage, die schlechter standardisierbar ist, oftmals schwerer zu erfüllen.

Die ZKBS empfiehlt, den Versuch so zu konzipieren, dass die Futter- und damit sowohl die Energie- und Nährstoffaufnahme als auch die Aufnahme der gentechnisch veränderten Futterkomponente sowie die unerwünschter Stoffe (z. B. Mykotoxine und Phytoöstrogene) einzeltierbezogen erfasst werden kann. Dies ermöglicht Aussagen zur Exposition (je kg Körpermasse und Tag). Die ZKBS weist darauf hin, dass eine einzeltierbezogene Erhebung der

Futteraufnahme entweder eine Einzelhaltung der Versuchstiere erfordert oder bei Gruppenhaltung einer Transponder-gestützten Abruffütterung bedarf.

- Versuchsdiäten (Test-, Kontroll- und ggf. Referenzdiäten)

Die ZKBS macht darauf aufmerksam, dass ein Versuch nur Rückschlüsse hinsichtlich des tatsächlich in die Testdiät eingebrachten gentechnisch veränderten Ausgangspflanzenmaterials in seiner Gesamtheit liefern kann.

Wird beispielsweise ein *stacked event* verwendet, das mehrere unterschiedliche Proteine exprimiert, gelten die Ergebnisse nur für dieses *stacked event*. Es ist dann außerdem nicht möglich, etwaige Effekte auf ein bestimmtes *single event* zurückzuführen oder auf die Kombination zweier oder auch mehrerer *single events*.

Soll die Wirkung von *single events* im Rahmen des geplanten Versuches untersucht werden, dann müssen zusätzlich zur eingangs festgelegten Testdiät mit dem *stacked event* noch weitere Testdiäten im Versuch eingesetzt werden (mit entsprechenden Versuchstiergruppen), in denen die dem *stacked event* zu Grunde liegenden *single events* jeweils einzeln und ggf. auch in verschiedenen Kombinationen enthalten sind.

Wie bereits erwähnt, müssen Test- und Kontrollpflanzen im selben Anbau generiert werden. Bei den Kontrollpflanzen soll es sich um die zugehörige nah-isogene Linie handeln. Die Kontrolldiät ist analog zur Testdiät herzustellen.

Um die natürliche Variabilität der bei den Schweinen zu untersuchenden Endpunkte zu bestimmen, ist es sinnvoll, eine oder auch mehrere Referenzgruppen ins Versuchsdesign zu integrieren. Die Referenzdiäten für diese Gruppen bestehen aus kommerziell verfügbarem Futter, das dem Kontroll- und Testfutter ähnelt. Sollte es sich bei dem zu testenden Pflanzenmaterial beispielsweise um Maispflanzenmaterial handeln, wäre es sinnvoll, Referenzdiäten zu verwenden, die anstelle des gentechnisch veränderten bzw. isogenen Maispflanzenmaterials Pflanzenmaterial aus konventionellem Mais enthalten, wobei die übrige Zusammensetzung der Futtermischungen unberührt bleibt. Um die normale, durch das Futtermittel Mais verursachte Variabilität abzubilden, sollten mindestens 3 Referenz-Maischargen verwendet werden. Der mit Hilfe der Referenz- und Kontrollgruppen ermittelte Bereich der natürlichen Variabilität der Endpunkte lässt eine Aussage darüber zu, ob die in der Testgruppe ermittelten Endpunktwerte innerhalb des für Schweine normalen und damit gesundheitlich unbedenklichen Bereiches liegen. Die Entscheidung für oder gegen die Einbeziehung von Referenzdiäten und ggf. deren Anzahl ist fallspezifisch zu begründen.

Sofern verfügbar und geeignet, können auch Literaturdaten und Erfahrungswerte, die in der Vergangenheit mit derselben Schweinerasse bzw. Kreuzung in der den Versuch durchführenden Versuchseinrichtung erhalten wurden, herangezogen werden, um den Bereich der

natürlichen Variabilität zu ermitteln. Die Eignung solcher Daten ist fallspezifisch zu begründen.

Wie bereits zuvor ausgeführt, setzt sich eine ausreichende Schweineration aus den Komponenten Energie-, Eiweiß- sowie Mineral- und Vitaminvormischung zusammen. Bei der Herstellung der Diäten sollten wenn möglich mit Ausnahme des Testmaterials keine Komponenten Verwendung finden, die gentechnisch verändertes Pflanzenmaterial enthalten oder daraus hergestellt worden sind. Dies gilt sowohl für die Testdiät (mit Ausnahme des zu testenden gentechnisch veränderten Ausgangspflanzenmaterials) als auch für die Kontroll- und Referenzdiäten.

Mittels molekularbiologischer Methoden soll bestätigt werden, dass die Testdiät tatsächlich das gentechnisch veränderte Pflanzenmaterial enthält und dass in den Kontroll- und Referenzdiäten die gentechnische Veränderung nicht nachgewiesen werden kann.

- Dosisgruppen und Dosierung

Sowohl die Anzahl der Dosisgruppen als auch die Dosierung(en) richten sich vornehmlich nach den Zielen, die mit der Fütterungsstudie erreicht werden sollen. Diese sind im Vorfeld genau abzuklären und festzulegen.

Zu klären ist vorab beispielsweise die Frage, ob es wichtig ist, die Haltungsbedingungen in der konventionellen Schweinemast möglichst real widerzuspiegeln. Soll die Studie die Mast-situation widerspiegeln, dann genügt ggf. je eine Dosisgruppe pro Test- und Kontrolldiät, wobei sich die Dosierung des Test- bzw. des Kontrollmaterials an den in der Praxis gängigen Futtermitteln und ihrer Zusammensetzung orientieren soll. Ein solches Studiendesign ist eher dazu geeignet, eine Untersuchung zur Ermittlung ernährungsphysiologischer Endpunkte durchzuführen als klassische toxikologische Fragestellungen zu bearbeiten (z. B. das Bestehen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung).

Steht andererseits eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und/oder Aussagen zu einer möglichen Dosis-Wirkungs-Beziehung im Vordergrund, so ist ein Versuchsdesign erforderlich, in welchem das zu testende Material in mehreren Dosierungen verabreicht wird. Es soll dann mindestens eine Niedrig- und eine Hochdosisgruppe geben. Die Niedrigdosis sollte zumindest mit der Menge vergleichbar sein, die dem erwarteten menschlichen Verzehr entspricht. Die Hochdosis soll dem höchstmöglichen Anteil des zu testenden Ausgangspflanzenmaterials entsprechen, der in die Diät eingebracht werden kann, ohne beim Versuchstier ein Ernährungsungleichgewicht zu verursachen. Zu jeder Testgruppe soll eine Kontrollgruppe existieren, die dieselbe Dosis an isogenem Kontrollmaterial erhält. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, je eine Hochdosisgruppe mit dem Kontroll- bzw. Testmaterial zu füttern und dazu eine (oder mehrere) weitere intermediäre Testgruppe(n) zu etablieren,

die sowohl Test- als auch Kontrollpflanzenmaterial in einem bestimmten Verhältnis enthält, wobei die Gesamtmenge des Test- und Kontrollpflanzenmaterials der Hochdosis entspricht.

Insgesamt soll die Wahl der Dosisgruppen und Dosierung(en) fallspezifisch anhand der Zielvorgaben der Studie und der zu testenden Arbeitshypothese erfolgen und ist entsprechend zu begründen. Die ZKBS macht darauf aufmerksam, dass Dosis-Wirkungs-Versuche in der Regel die gleichzeitige Prüfung von Referenzdiäten aus Kapazitätsgründen verhindern.

- Alter, Geschlecht und Anzahl der Tiere

In der Schweineproduktion durchleben die Ferkel nach ihrer Geburt zunächst eine Säuge- und anschließend eine Aufzuchtphase, bevor sie im Alter von ca. 9-10 Wochen und einem Gewicht um die 28 kg in den Mastbereich versetzt werden. Die hier stattfindende Mastphase dauert ca. 17-18 Wochen, bis die Schweine im Alter von etwa 6 Monaten geschlachtet werden.

Vor diesem Hintergrund ist bezüglich der dem Versuch zu Grunde liegenden Fragestellung zunächst zu klären, ob der Einfluss des gentechnisch veränderten Futters unter Einbeziehung der Aufzuchtphase oder nur für die Mastphase untersucht werden soll. Für Letzteres ist zu bedenken, dass die auf einem solchen Studiendesign basierenden Ergebnisse keine Aussagen über einen etwaigen Einfluss des gentechnisch veränderten Futters auf die Aufzuchtphase und sich daraus möglicherweise ergebenden Konsequenzen für die Mastphase zulassen. Die Wahl, ob die Versuchsdüden bereits in der Aufzucht- oder erst in der Mastphase verabreicht werden, soll fachlich begründet werden. Soll die Testfütterung erst ab der Mastphase beginnen, sollte das in der Aufzuchtphase verwendete Futter wenn möglich frei von gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial sein. Auch eine mehrtägige Akklimatisierungsphase der entwöhnten Ferkel an die Versuchsbedingungen ist in Erwägung zu ziehen. Die Entscheidung für oder gegen eine Akklimatisierungsphase ist fachlich zu begründen.

Es sollten sowohl männliche als auch weibliche Tiere getestet werden. Die ZKBS weist darauf hin, dass in Deutschland und vielen anderen Ländern nur Sauen und Börgen (kastrierte Eber) in der Schweinemast eingesetzt werden. Die Hoden werden den männlichen Ferkeln meist im Alter von drei Tagen entfernt. Je nach Zielvorgabe kann es sinnvoll sein, den Versuch mit kastrierten oder aber mit nicht kastrierten Ebern durchzuführen. Dabei ist zu berücksichtigen, ob der Versuch die realen Bedingungen in der konventionellen Schweinemast widerspiegeln oder ob der Versuch die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen mit einbeziehen soll. Die Entscheidung für oder gegen eine Kastration der männlichen Tiere ist fallspezifisch zu begründen.

Um die Anzahl an Tieren zu bestimmen, die für den Versuch notwendig sind, bedarf es einer klar festgelegten Zielvorgabe (oder mehrerer) und einer prospektiven Poweranalyse. Die

ZKBS weist in diesem Zusammenhang darauf hin, dass laut Tierschutzgesetz für den Tierversuch nicht mehr Tiere verwendet werden dürfen, als für den verfolgten Zweck erforderlich sind. Zur Stichprobenplanung muss eine Erwartung über den möglichen Ausgang des Experimentes in Form von Hypothesen formuliert werden. Die ZKBS empfiehlt, dass bei der Planung eines konkreten Versuchsvorhabens ein Statistiker/Biometriker hinzugezogen wird.

Die Tiere innerhalb einer Box bilden eine experimentelle Einheit und können keine unterschiedlichen Diäten erhalten. Das experimentelle Design muss so gestaltet werden, dass mit Ausnahme der unterschiedlichen Futterbehandlung keine systematischen Unterschiede zwischen den in mehreren verschiedenen Boxen gehaltenen Schweinegruppen bestehen. Dies wird vor allem durch eine ausreichende Randomisierung der Aufstallung erreicht. Um eine angemessene statistische Analyse zu ermöglichen, werden Wiederholungen innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen (Test-, Kontroll- und ggf. Referenzgruppen) empfohlen. Überdies ist es sinnvoll, den Versuch mittels eines Kodiersystems zu verblinden, so dass die Mitarbeiter nicht wissen, welche der Gruppen Test-, Kontroll- und ggf. Referenzdiäten erhalten.

- Berücksichtigung von zwischenzeitlichen Tötungen (*interim kills*)

Zwischenzeitliche Tötungen können dazu genutzt werden, um Informationen über Entwicklung und Verlauf möglicher durch die Testfütterung induzierter negativer Effekte zu erhalten und kommen insbesondere für Langzeitstudien in Betracht. Falls *interim kill*-Gruppen für erforderlich gehalten werden, ist die Zahl der Tiere für diese Gruppen fallspezifisch zu ermitteln und zu begründen.

- Dauer der Studie

Die Studiendauer ist fallspezifisch entsprechend der dem Versuchsvorhaben zu Grunde liegenden Fragestellung(en) bzw. Zielvorgabe(n) festzusetzen und fachlich zu begründen.

Sollen beispielsweise Ergebnisse erzielt werden, die relevante Aussagen hinsichtlich der konventionellen Schweinemast ermöglichen, so ist zu beachten, dass die Schweine hier ihr Mastendgewicht im Alter von ca. 6 Monaten erreichen und dann geschlachtet werden. Eine 6-monatige Studie wäre also dazu geeignet, ernährungsphysiologische Aspekte wie die Mastleistung zu erfassen. Auch könnte eine Aussage dazu gemacht werden, ob durch die Verfütterung des Testmaterials in der kommerziellen Schweinemast nachteilige gesundheitliche Effekte zu erwarten sind. Hingegen wäre eine solche Studiendauer nicht dazu geeignet, Aussagen über mögliche gesundheitsschädigende Wirkungen, die sich aus einer Langzeitverfütterung des Materials ergeben könnten, zu treffen. In diesem Fall müssten längere Versuchszeiten eingeplant werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Schweine bis zu 10 Jahre alt werden können.

3. Endpunkte

Geeignete Endpunkte sind fallspezifisch entsprechend der im konkreten Einzelfall vorliegenden Fragestellung festzulegen.

In jedem Fall ist eine regelmäßige visuelle Beobachtung bzw. Kontrolle der Tiere über die gesamte Versuchsdauer zu empfehlen. Dabei soll der allgemeine Gesundheitszustand und das Fressverhalten der Tiere sowie das Auftreten von Verhaltensauffälligkeiten und klinische Zeichen einer Erkrankung beobachtet und dokumentiert werden.

Im Fall von Fragestellungen, die sich auf ernährungsphysiologische Aspekte (Leistungsparameter) beziehen, sind beispielsweise die Endpunkte Körpergewichtszunahme, Futterverbrauch und Futtermittelverwertung gut geeignet.

Da eine Vielzahl toxikologischer Fragestellungen (Gesundheitseffekte) denkbar ist, ist die Zahl möglicher Endpunkte entsprechend groß. Dazu gehören u. a. verschiedene hämatologische und klinisch-biochemische Parameter, eine Nekropsie der Tiere, die Bestimmung der absoluten und relativen Gewichte von Organen, die für die spezifische(n) Fragestellung(en) relevant sind, sowie histopathologische Untersuchungen. Darüber hinaus kann es im Einzelfall notwendig sein, weitere Endpunkte zu bestimmen.

Literaturverweise

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Scientific Opinion on Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal* 2011; 9(5): 2150. [37 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2150.

OECD (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds* No.6, ENV/JM/MONO (2002)25.

OECD (2012) Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: key food and feed nutrients, anti-nutrients, toxicants and allergens. *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds* No.25, ENV/JM/MONO (2012)24.