



Rat der
Europäischen Union

Brüssel, den 14. September 2016
(OR. en)

12209/16
ADD 1

COMPET 482
ENV 583
CHIMIE 47
MI 574
ENT 168
SAN 324
CONSOM 212

ÜBERMITTLUNGSVERMERK

Absender:	Europäische Kommission
Eingangsdatum:	5. September 2016
Empfänger:	Generalsekretariat des Rates

Betr.:	VERORDNUNG (EU) .../... DER KOMMISSION vom XXX zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)
--------	---

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Dokument D045907/02.

Anl.: D045907/02

DE

ANHANG

Der Anhang zur Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird wie folgt geändert:

(1) In Teil A wird das folgende Kapitel hinzugefügt:

„A.25 Dissoziationskonstanten in Wasser (Titrationsverfahren - spektrofotometrisches Verfahren - konduktometrisches Verfahren)

EINLEITUNG

Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 112 (1981).

Voraussetzungen

- Geeignete Analysemethode
- Wasserlöslichkeit

Leitlinien

- Strukturformel
- Elektrische Leitfähigkeit für konduktometrisches Verfahren

Einschränkende Aussagen

- Alle Prüfmethode können an reinen Stoffen oder Stoffen handelsüblicher Qualität durchgeführt werden. Die potenziellen Auswirkungen von Verunreinigungen auf die Ergebnisse sind zu berücksichtigen.
- Das Titrationsverfahren ist für Stoffe mit geringer Löslichkeit nicht geeignet (siehe Prüflösungen unten).
- Das spektrofotometrische Verfahren ist nur bei Stoffen anwendbar, deren UV/VIS-Absorptionsspektren sich in der dissoziierten und undissoziierten Form jeweils deutlich unterscheiden. Dieses Verfahren eignet sich möglicherweise auch für Stoffe mit geringer Löslichkeit und nicht-saure/basische Dissoziationsformen (z. B. Komplexbildung).

- In Fällen, in denen die Onsagersche Gleichung anwendbar ist, kann das konduktometrische Verfahren angewendet werden, selbst bei mäßig niedrigen Konzentrationen und auch in Fällen von Nichtsäure-/Basen-Gleichgewichten.

Standarddokumente

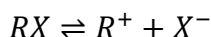
Diese Prüfmethode beruht auf den Verfahren, auf die im Abschnitt „Literaturhinweise“ verwiesen wird, sowie auf dem Leitfaden der EPA „Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification“ vom 18. August 1978.

METHODE – EINLEITUNG, ZWECK, ANWENDUNGSBEREICH, RELEVANZ, ANWENDUNG UND VERSUCHSGRENZEN

Die Dissoziation eines Stoffes in Wasser ist wichtig für die Beurteilung seiner Auswirkungen auf die Umwelt. Sie bestimmt die Form des Stoffes, die wiederum für das Verhalten und den Transport des Stoffes maßgeblich ist. Sie beeinflusst möglicherweise die Anlagerung der Chemikalie an Böden und Sedimente und ihr Eindringen in biologische Zellen (Absorption).

Definitionen und Einheiten

Unter Dissoziation versteht man den reversiblen Vorgang der Spaltung einer chemischen Spezies in zwei oder mehrere chemische Stoffe, die auch in ionischer Form vorliegen können. Dieser Vorgang wird im Allgemeinen wie folgt angegeben:



Die der Reaktion zugrunde liegende Gleichgewichtskonstante der Konzentration ist

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Handelt es sich bei R beispielsweise um Wasserstoff (eine Säure), ist die Konstante

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

oder

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referenzsubstanzen

Die folgenden Referenzstoffe müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Substanz untersucht wird. Sie werden hier vor allem angegeben, damit die Methode gelegentlich kalibriert werden kann und um die Ergebnisse mit denen anderer Methoden vergleichen zu können.

	pK _a (1)	Temp. in ° C
p-Nitrophenol	7,15	25 ¹
Benzoessäure	4,12	20
p-Chloroanilin	3,93	20

¹ Für 20 °C ist kein Wert verfügbar, aber es kann davon ausgegangen werden, dass die Variabilität der Messergebnisse höher ist als die zu erwartende Temperaturabhängigkeit.

Sinnvoll wäre ein Stoff mit mehreren pKs (siehe „Prinzip der Prüfmethode“), z. B.

Zitronensäure	pK _a (8)	Temp. in ° C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Prinzip der Prüfmethode

Das beschriebene chemische Verfahren ist im umweltrelevanten Temperaturbereich in der Regel nur wenig temperaturabhängig. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ist eine Messung der Konzentrationen des chemischen Stoffes in seiner dissoziierten und undissoziierten Form erforderlich. Aus dem stöchiometrischen Verhältnis der Dissoziationsreaktion (siehe „Definitionen und Einheiten“) lässt sich die jeweilige Konstante bestimmen. In dem bei dieser Prüfmethode beschriebenen besonderen Fall verhält sich der Stoff wie eine Säure oder Base, und die Bestimmung erfolgt am besten mittels Bestimmung der relativen Konzentrationen der ionisierten und nichtionisierten Formen des Stoffes und des pH-Werts der Lösung. Welche Beziehung zwischen diesen Begriffen besteht, ist der Gleichung für pK_a in „Definitionen und Einheiten“ zu entnehmen. Für einige Stoffe ergeben sich mehrere Dissoziationskonstanten, und es lassen sich ähnliche Gleichungen aufstellen. Einige der hier beschriebenen Methoden eignen sich auch für nicht-saure/basische Dissoziationen.

Qualitätskriterien

Wiederholbarkeit

Die Dissoziationskonstante sollte mit einer Toleranz von $\pm 0,1$ log-Einheiten repliziert werden (mindestens dreifache Bestimmung).

BESCHREIBUNG DER PRÜFVERFAHREN

Zur Bestimmung des pK_a -Wertes stehen zwei grundlegende Ansätze zur Verfügung - Titration einer bekannten Menge des Stoffes mit einer Standardsäure bzw. Standardbase und Bestimmung der relativen Konzentration der ionisierten und nichtionisierten Formen und ihrer pH-Abhängigkeit.

Vorbereitungen

Die auf diesen Grundsätzen basierenden Methoden können als Titrationsverfahren, spektrofotometrische Verfahren und konduktometrische Verfahren klassifiziert werden.

Testlösungen

Beim Titrier- und konduktometrischen Verfahren sollte die chemische Substanz in destilliertem Wasser gelöst werden. Beim spektrofotometrischen und bei anderen Verfahren werden Pufferlösungen verwendet. Die Konzentration des Prüfstoﬀs sollte den niedrigeren der beiden Werte - 0,01 M bzw. die Hälfte der Sättigungskonzentration - nicht überschreiten, und bei der Herstellung der Lösungen sollte die reinste verfügbare Form der Substanz verwendet werden. Sofern der Stoff nur schwer löslich ist, kann er in einer kleinen Menge wassermischbaren Lösungsmittels gelöst werden, bevor er den oben genannten Konzentrationen zugegeben wird.

Die Lösungen sollten mithilfe eines Tyndall-Strahls auf Emulsionen überprüft werden, insbesondere wenn ein Zusatzlösungsmittel zur Verbesserung der Löslichkeit verwendet wurde. Sofern Pufferlösungen verwendet werden, sollte die Konzentration 0,05 M nicht überschreiten.

Prüfbedingungen

Temperatur

Temperaturkonstanz sollte mit einer Toleranz von $\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ gewährleistet sein. Die Bestimmung sollte am besten bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ erfolgen.

Wenn eine erhebliche Temperaturabhängigkeit vermutet wird, sollte die Bestimmung bei mindestens zwei weiteren Temperaturwerten erfolgen. Die Temperaturintervalle sollten im vorliegenden Fall $10\text{ }^\circ\text{C}$ betragen, und Temperaturkonstanz sollte mit einer Toleranz von $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ gewährleistet sein.

Analysen

Die Methode richtet sich nach der Art des Prüfstoﬀs. Er muss ausreichend empfindlich sein,

damit eine Bestimmung der unterschiedlichen Spezies bei jeder Konzentration der Testlösung möglich ist.

Durchführung des Tests

Titrimationsverfahren

Die Bestimmung der Prüflösung erfolgt durch Titration mit der Standardsäure- bzw. Standardbasenlösung, wobei nach jeder Zugabe des Titranten der pH-Wert gemessen wird. Vor Erreichen des Äquivalenzpunktes sollten mindestens 10 inkrementelle Zugaben erfolgen. Wenn ein Gleichgewicht relativ schnell erreicht wird, kann ein Kompensationschreiber (Potenziometer) verwendet werden. Für dieses Verfahren müssen sowohl die Gesamtmenge des Stoffes als auch seine Konzentration genau bekannt sein. Es müssen Vorkehrungen zum Ausschluss von Kohlendioxid getroffen werden. In den Standardtests sind Verfahren, Vorsichtsmaßnahmen und Berechnungsmethoden im Einzelnen beschrieben (vgl. Literaturhinweise (1), (2), (3), (4)).

Spektrofotometrisches Verfahren

Es wird eine Wellenlänge ermittelt, bei der sich die Extinktionskoeffizienten der ionisierten und nichtionisierten Formen des Stoffes deutlich unterscheiden. Das UV/VIS-Absorptionsspektrum wird aus Lösungen mit konstanter Konzentration bei einem pH-Wert, bei dem der Stoff im Wesentlichen nichtionisiert und bei dem sie vollständig ionisiert vorliegt, sowie bei mehreren pH-Zwischenwerten ermittelt. Dies geschieht entweder durch Zugabe von Inkrementen konzentrierter Säure (Base) zu einem relativ großen Volumen einer Lösung der Substanz in einem Mehrkomponentenpuffer bei einem anfangs hohen (niedrigen) pH-Wert (Literaturhinweis 5) oder durch Zugabe gleicher Mengen einer Stammlösung des Stoffes z. B. in Wasser oder Methanol zu konstanten Volumina verschiedener Pufferlösungen, die den gewünschten pH-Bereich abdecken. Aus den pH- und Absorptionswerten bei der gewählten Wellenlänge wird eine ausreichende Anzahl von Werten für den pK_a -Wert berechnet; dabei werden Daten aus mindestens 5 pH-Bereichen verwendet, in denen die Substanz zu mindestens 10 Prozent und zu weniger als 90 Prozent ionisiert ist. Für weitere Einzelheiten zum Versuch und zur Berechnungsmethode siehe Literaturhinweis (1).

Konduktometrisches Verfahren

Anhand einer Zelle mit niedriger, bekannter Zellkonstante wird die Leitfähigkeit einer ca. 0,1 M-Lösung der Substanz in Leitfähigkeitswasser gemessen. Ferner werden die Leitfähigkeiten einiger akkurat hergestellter Verdünnungen dieser Lösung gemessen. Die Konzentration wird jedes Mal halbiert, und die Reihen sollten verschiedene Konzentrationen in abgestufter Reihenfolge umfassen. Die Grenzleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung lässt sich ermitteln, indem ein ähnlicher Versuch mit Na-Salz durchgeführt und extrapoliert wird. Der Dissoziationsgrad lässt sich sodann aus der Leitfähigkeit der jeweiligen Lösung nach der Onsagerschen Gleichung ermitteln, und die

Dissoziationskonstante kann anschließend nach dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz als $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ berechnet werden, wobei C der Konzentration in Mol pro Liter und α dem dissoziierten Teil entspricht. Es müssen Vorkehrungen zum Ausschluss von CO_2 getroffen werden. Für weitere Einzelheiten zum Versuch und zur Berechnungsmethode siehe Standardtexte und Literaturhinweise (1), (6) und (7).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Ergebnisauswertung

Titrimationsverfahren

Der pK_a -Wert wird für 10 Messpunkte auf der Titrationkurve gemessen. Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser pK_a -Werte errechnet. Es sollte eine Korrelationskurve pH-Wert/Volumen der Standardbase oder -säure in tabellarischer Form erstellt werden.

Spektrofotometrisches Verfahren

Das Absorptionsmaß und der pH-Wert werden für jedes Spektrum tabellarisch erfasst. Aus den Datenpunkten der Zwischenspektren werden mindestens fünf Werte für den pK_a berechnet, ebenso wie die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Ergebnisse.

Konduktometrisches Verfahren

Die Äquivalentleitfähigkeit Λ wird für jede Säurekonzentration und für jede Konzentration eines Gemisches aus einem Säureäquivalent plus einem 0,98 Äquivalent karbonatfreier Natronlauge ermittelt. Die Säure liegt im Überschuss vor, um einen hydrolysebedingten Überschuss an OH^- zu vermeiden. $1/\Lambda$ wird gegen \sqrt{C} aufgetragen, und Λ_0 des Salzes lässt sich durch Extrapolation zur Nullkonzentration ermitteln.

Λ_0 der Säure lässt sich anhand von Literaturwerten für H^+ und Na^+ berechnen. Der pK_a lässt sich für jede Konzentration aus $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ und $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ ermitteln. Man erhält bessere Werte für K_a , indem Korrekturen für Mobilität und Aktivität vorgenommen werden. Es sollten die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser pK_a -Werte berechnet werden.

Prüfbericht

Anzugeben sind sämtliche Rohdaten, die berechneten pK_a -Werte und die Berechnungsmethode (am besten in tabellarischer Form, wie in Literaturhinweis (1) empfohlen), ebenso wie die oben beschriebenen statistischen Parameter. Bei Titrimationsverfahren sind nähere Angaben zur Standardisierung der Titranten zu machen.

Beim spektrofotometrischen Verfahren sind alle Spektren anzugeben. Beim konduktometrischen Verfahren sollten nähere Angaben zur Bestimmung der Zellkonstante gemacht werden. Zudem sind Angaben zum angewandten Verfahren, zur Analysemethode und zur Art des verwendeten Puffers zu machen.

Die Prüftemperatur(en) sollte(n) festgehalten werden.

LITERATURHINWEISE

- (1) Albert, A. & Sergeant, E.P., *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.
- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D., *Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides*, *Env. Sci. Tech.* 3, II, S. 1186-1188 (1969).
- (3) ASTM D 1293 - Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14. Ausgabe, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
- (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E., *Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution*. *Chem. Ind. (London)* 281, (März 1973).
- (6) ASTM D 1125 - Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (7) Standard Method 205 - APHA/AWWA/NPCF (siehe (4)).
- (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).“

(2) In Teil B erhält Kapitel B.5 folgende Fassung:

„B.5 Akute Augenreizung/-verätzung

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 405 (2012). Die OECD-Prüfrichtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig überprüft, um sicherzustellen, dass sie den besten verfügbaren wissenschaftlichen Erkenntnissen entsprechen. Bei vorangegangenen Überprüfungen dieser Prüfrichtlinien wurde ein besonderes Augenmerk auf mögliche Verbesserungen durch die Auswertung aller vorhandenen Informationen über die Prüfchemikalie gelegt, um unnötige Versuche an Labortieren zu vermeiden und somit auch Belange des Tierschutzes zu berücksichtigen. Die (1981 verabschiedete und 1987, 2002 und 2012 aktualisierte) Prüfrichtlinie 405 beinhaltet die Empfehlung, vor der Durchführung des beschriebenen *In-vivo*-Tests zur Ermittlung der akuten Reiz-/Ätzwirkung des Stoffs auf die Augen eine evidenzbasierte kritische Analyse (*Weight-of-Evidence analysis*, WoE-Analyse) (1) der bereits vorhandenen einschlägigen Daten vorzunehmen. Sofern nicht genügend Daten zur Verfügung stehen, können diese mit Hilfe sequenzieller Tests generiert werden (2) (3). Die Prüfstrategie, die ergänzend zu dieser Prüfmethode empfohlen wird, sieht die Durchführung validierter und anerkannter *In-vitro*-Tests vor. Für die Zwecke der Verordnung EG (Nr.) 1907/2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)¹ wird außerdem eine integrierte Prüfstrategie in die entsprechende ECHA-Leitlinie (21) aufgenommen. Tierversuche sollten nur dann durchgeführt werden, wenn deren Notwendigkeit nach Abwägen verfügbarer alternativer Methoden festgestellt und die Anwendung der so ermittelten Methoden für angemessen befunden wurde. Zum Zeitpunkt der Ausarbeitung dieser aktualisierten Prüfmethode gibt es nach wie vor Fälle, in denen die Anwendung dieser Prüfmethode noch immer notwendig oder gesetzlich vorgeschrieben ist.

¹ Verordnung EG (Nr.) 1907/2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ABl. L 304 vom 22.11.2007, S. 1.

2. Bei der letzten Aktualisierung lag Der Schwerpunkt in erster Linie auf der Verwendung von Analgetika und Anästhetika; das grundlegende Konzept und der Aufbau der Prüfrichtlinien blieben unberührt. ICCVAM¹ und eine unabhängige internationale wissenschaftliche *Peer-Review*-Gruppe überprüften den Nutzen und die Grenzen einer routinemäßigen Verwendung topischer Anästhetika, systemischer Analgetika und humaner Endpunkte bei *In-vivo*-Sicherheitstests zur Ermittlung von Augenreizungen (12). Die Überprüfung ergab, dass durch die Verwendung topischer Anästhetika und systemischer Analgetika Schmerzen und Leiden ganz oder zu einem Großteil vermieden werden könnten, ohne die Testergebnisse zu beeinträchtigen, und es wurde ein genereller Einsatz dieser Stoffe empfohlen. Bei der vorliegenden Prüfmethode wurde diese Überprüfung berücksichtigt. Topische Anästhetika, systemische Analgetika und humane Endpunkte sollten bei *In-vivo*-Tests zur Feststellung akuter Augenreizung/-verätzungen routinemäßig eingesetzt werden. Ausnahmen sind zu begründen. Die in dieser Methode beschriebenen Verfeinerungen werden bei den meisten Versuchen, bei denen Sicherheitstests zur Feststellung von Augenreizungen am lebenden Tier nach wie vor erforderlich sind, erheblich zur Verringerung oder Vermeidung von Schmerzen und Leiden bei den Versuchstieren beitragen.
3. Eine ausgewogene präventive Schmerzbehandlung sollte Folgendes umfassen: i) eine routinemäßige Vorbehandlung mit einem topischen Anästhetikum (z. B. Proparacain oder Tetracain) und einem systemischen Analgetikum (z. B. Buprenorphin), ii) eine routinemäßige Nachbehandlung mit systemischen Analgetika (z. B. Buprenorphin und Meloxicam), iii) eine planmäßige Beobachtung und Überwachung von Tieren mit Aufzeichnung klinischer Anzeichen von Schmerzen und/oder Leiden und iv) eine planmäßige Beobachtung, Überwachung und Erfassung der Art, des Schweregrads und des Verlaufs sämtlicher Augenverletzungen. Für weitere Details siehe die nachfolgend beschriebenen aktualisierten Verfahren. Nach Verabreichung der Prüfchemikalie sollten keine zusätzlichen topischen Anästhetika oder Analgetika gegeben werden, um eine Beeinträchtigung der Studie zu vermeiden. Analgetika mit entzündungshemmender Wirkung (z. B. Meloxicam) sollten nicht topisch aufgetragen werden und systemisch verabreichte Dosen sollten nicht mit den Wirkungen auf die Augen interferieren.
4. Definitionen finden sich in der Anlage zur Prüfmethode.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

¹ Das US-amerikanische Validierungszentrum („Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods“).

5. Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes sollen *In-vivo*-Tests erst dann in Erwägung gezogen werden, wenn alle für das Hautverätzungs-/reizungspotenzial der Chemikalie zur Verfügung stehenden einschlägigen Daten auf Basis ihrer Beweiskraft (*weight-of-evidence*, *WoE*) ausgewertet worden sind. Zu diesen Daten gehören unter anderem Erkenntnisse aus bereits durchgeführten Untersuchungen am Menschen und/oder an Labortieren, Hinweise auf Verätzungen/Reizungen durch eine oder mehrere strukturell verwandte Substanzen oder Gemische aus diesen Substanzen, Daten, die eine starke Azidität oder Alkalinität der Substanz belegen (4) (5) und Ergebnisse validierter und anerkannter *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests auf Hautverätzungen und -reizungen (6) (13) (14) (15) (16) (17). Diese Studien können sowohl vor als auch nach einer *WoE*-Analyse durchgeführt worden sein.
6. Für bestimmte Chemikalien ergibt eine solche Analyse möglicherweise, dass deren Augenverätzungs-/reizungspotenzial im Rahmen von *In-vivo*-Studien untersucht werden muss. In all diesen Fällen sollten zunächst die augenverätzenden Wirkungen der Chemikalie *in vitro* und/oder *in vivo* untersucht und nach der sequenziellen Prüfstrategie in Prüfmethode B.4 (7) oder nach der in der ECHA-Leitlinie (21) beschriebenen integrierten Prüfstrategie evaluiert werden, bevor ein *In-vivo*-Augentest in Erwägung gezogen wird.
7. Ergänzend zu dieser Prüfmethode wird eine sequenzielle Prüfstrategie, die auch validierte *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests auf Augenverätzungs-/reizungswirkungen vorsieht, in diese Prüfmethode und, für die Zwecke der REACH-Verordnung, auch in die ECHA-Leitlinie (21) aufgenommen. Es wird empfohlen, dass eine solche sequenzielle Prüfstrategie vor einem *In-vivo*-Test durchgeführt wird. Für neue Chemikalien wird ein stufenweiser Prüfansatz empfohlen, um wissenschaftliche fundierte Daten über die durch die Chemikalie bedingte Verätzung/Reizung erheben zu können. Bei bereits bekannten Chemikalien, für die nicht genügend Daten zum Hautverätzungs-/reizungspotenzial bzw. Augenverätzungs-/reizungspotenzial vorliegen, kann die Strategie genutzt werden, um Datenlücken zu schließen. Die Anwendung einer anderen Prüfstrategie bzw. eines anderen Prüfverfahrens oder die Entscheidung gegen einen stufenweisen Prüfansatz sollten begründet werden.

PRINZIP DES *IN-VIVO*-TESTS

8. Nach einer Vorbehandlung mit einem systemischen Analgetikum und nach Einleitung einer geeigneten topischen Anästhesie wird die zu prüfende Chemikalie als Einzeldosis in ein Auge des Versuchstiers geträufelt; das unbehandelte Auge dient als Kontrolle. Der Grad der Reizung/Verätzung wird bestimmt, indem in zuvor festgelegten Zeitabständen und anhand einer Punkteskala Schädigungen der Bindehaut, der Hornhaut und der Iris bewertet werden. Es werden auch andere Reaktionen des Auges und systemische Schäden erfasst, um die Wirkungen umfassend beurteilen zu können. Die Beobachtungsdauer sollte lang

genug sein, um die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Wirkungen evaluieren zu können.

9. Tiere, die zu irgendeinem Zeitpunkt während des Versuchs Anzeichen schweren Leidens und/oder starker Schmerzen oder Läsionen aufweisen, die den in dieser Prüfmethode beschriebenen humanen Endpunkten (siehe Nummer 26) entsprechen, sollten human getötet werden, und die Chemikalie ist entsprechend einzustufen. Kriterien für die Entscheidung über die humane Tötung moribunder Tiere mit starken Leidensanzeichen sind Gegenstand eines OECD-Leitfadens (8).

VORBEREITUNG DES *IN-VIVO*-TESTS

Auswahl der Tierart

10. Bevorzugtes Labortier für den Test sind gesunde, junge, geschlechtsreife Albino-Kaninchen. Die Verwendung anderer Stämme oder Arten sollte begründet werden.

Vorbereitung der Versuchstiere

11. Innerhalb von 24 Stunden vor dem Versuch werden bei jedem der ausgewählten Versuchstiere beide Augen untersucht. Tiere, bei denen bereits eine Augenreizung, okulare Defekte oder eine Hornhautschädigung vorliegen, sollen nicht verwendet werden.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

12. Die Tiere sollen einzeln gehalten werden. Die Temperatur im Versuchsterraum sollte für Kaninchen 20 °C (± 3 °C) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % und außer während der Raumreinigung maximal 70 % betragen sollte, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Der Raum soll künstlich beleuchtet sein, mit Hell-/Dunkelphasen im 12-Stunden-Rhythmus. Überhöhte Lichtintensität sollte vermieden werden. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

PRÜFVERFAHREN

Verwendung topischer Anästhetika und systemischer Analgetika

13. Es wird empfohlen, zur Verringerung oder Vermeidung von Schmerzen und Leiden bei Augensicherheitsprüfungen wie nachstehend beschrieben vorzugehen. Ersatzweise können auch alternative Verfahren angewendet werden, mit denen sich Schmerzen und Leiden nachweislich ebenso gut oder sogar besser vermeiden oder lindern lassen.

- Sechzig Minuten vor Applikation der Prüfchemikalie 0,01 mg/kg Buprenorphin subkutan injizieren, um einen therapeutischen Grad systemischer Analgesie zu erreichen. Für Buprenorphin und andere vergleichbare opioide Analgetika, die systemisch verabreicht werden, sind keine veränderten Augenreaktionen bekannt oder zu erwarten (12).
- Fünf Minuten vor Applikation der Prüfchemikalie ein oder zwei Tropfen eines topischen Augenanästhetikums (z. B. 0,5 % Proparacainhydrochlorid oder 0,5 % Tetracainhydrochlorid) in jedes Auge des Versuchstiers träufeln. Um eine mögliche Beeinflussung der Studie zu vermeiden, wird ein topisches Anästhetikum empfohlen, das keine Konservierungsstoffe enthält. Das Auge des Versuchstiers, das nicht mit der Prüfchemikalie, sondern nur mit dem topischen Anästhetikum behandelt wurde, dient als Kontrolle. Wenn zu erwarten ist, dass die Prüfchemikalie starke Schmerzen und Leiden verursacht, sollte sie unter möglichst nicht *in vivo* getestet werden. Wenn diesbezüglich Zweifel bestehen oder wenn Versuche durchgeführt werden müssen, sollten weitere Applikationen des topischen Anästhetikums in Abständen von 5 Minuten in Erwägung gezogen werden, bevor die Prüfchemikalie appliziert wird. Labortechniker sollten bedenken, dass mehrfache Applikationen topischer Anästhetika möglicherweise einen leichten Anstieg des Schweregrads chemisch induzierter Schädigungen und/oder der für ein Ausheilen derselben erforderlichen Zeit bewirken können.
- Acht Stunden nach Applikation der Prüfchemikalie subkutan 0,01 mg/kg Buprenorphin und 0,5 mg/kg Meloxicam injizieren, um den therapeutischen Grad der systemischen Analgesie aufrechtzuerhalten. Auch wenn keine Daten vorliegen, die darauf hinweisen, dass Meloxicam bei einmal täglicher subkutaner Verabreichung entzündungshemmende Wirkung auf die Augen hat, sollte Meloxicam frühestens 8 Stunden nach Applikation der Prüfchemikalie verabfolgt werden, um eine mögliche Beeinflussung der Studie zu vermeiden (12).
- Nach der anfänglichen Behandlung 8 Stunden nach Applikation der Prüfchemikalie alle 12 Stunden subkutan 0,01 mg/kg Buprenorphin und alle 24 Stunden subkutan 0,5 mg/kg Meloxicam verabreichen, bis die Augenschädigungen ausheilen und keine klinischen Anzeichen für Schmerzen und Leiden mehr vorliegen. Es stehen Depot-Analgetikapräparate mit Depotwirkung zur Verfügung, deren Einsatz in Betracht gezogen werden könnte, um die Häufigkeit der Gabe von Analgetika zu reduzieren.
- Unverzüglich nach Applikation der Prüfchemikalie sollte eine Auffrischungsdosis Analgetika verabreicht werden, wenn präventive Analgetika und topische Anästhetika unzulänglich sind. Zeigt ein Versuchstier während der Studie Anzeichen von Schmerzen und Leiden, sollte unverzüglich eine Auffrischungsdosis 0,03 mg/kg Buprenorphin subkutan verabreicht und bei Bedarf alle 8 Stunden anstatt mit 0,01 mg/kg alle 12 Stunden erneuert werden. 0,5 mg/kg Meloxicam sollte subkutan alle 24 Stunden zusammen mit der Auffrischungsdosis Buprenorphin verabfolgt werden, frühestens jedoch 8 Stunden nach Applikation der Prüfchemikalie.

Applikation der Prüfchemikalie

14. Die Prüfchemikalie sollte bei jedem Tier in den Bindehautsack eines Auges appliziert werden, indem das untere Lid leicht vom Augapfel weggezogen wird. Die Lider dann etwa

eine Sekunde lang leicht zusammendrücken, damit kein Prüfmaterial verloren geht. Das andere, unbehandelte Auge dient als Kontrolle.

Ausspülen

15. Die Augen der Versuchstiere sollten frühestens 24 Stunden nach Applikation der Prüfchemikalie ausgewaschen werden; Ausnahmen gelten für Feststoffe (siehe Nummer 18) und bei sofortigem Eintritt einer Ätz- oder Reizwirkung. Nach 24 Stunden kann eine Augenspülung erfolgen, sofern dies für angemessen gehalten wird.
16. Untersuchungen an einer zusätzlichen Versuchstiergruppe (Satellitengruppe) zur Erforschung des Einflusses des Ausspülens wird nicht empfohlen, außer in wissenschaftlich begründeten Fällen. Sollte eine Satellitengruppe tatsächlich benötigt werden, sind zwei Kaninchen vorzusehen. Die Bedingungen, unter denen die Augenspülung erfolgte (Zeitpunkt, Zusammensetzung und Temperatur der Spüllösung, Dauer, Volumen und Geschwindigkeit der Applikation) sollten genau dokumentiert werden.

Dosierung

(1) Prüfung von Flüssigkeiten

17. Bei der Prüfung von Flüssigkeiten eine Dosis von 0,1 ml verwenden. Liegt die Prüfchemikalie als Pumpspray vor, sollte sie nicht direkt ins Auge gesprüht, sondern mittels Sprühstoß entnommen und in einem Behälter aufgefangen werden. Anschließend 0,1 ml in das Auge einträufeln.

(2) Prüfung von Feststoffen

18. Bei Feststoffen, Pasten und partikelförmigen Chemikalien sollte die Prüfmenge ein Volumen von 0,1 ml oder ein Gewicht von höchstens 100 mg haben. Die Prüfchemikalie sollte zu einem feinen Pulver zermahlen werden. Das Volumen von Feststoffen sollte erst nach vorsichtigem Kompaktieren, z. B. durch Klopfen des Messbehälters, bestimmt werden. Ist die in Form eines Feststoffs vorliegende Prüfchemikalie bis zum ersten Beobachtungszeitpunkt, d. h. 1 Stunde nach der Applikation, nicht aufgrund physiologischer Vorgänge aus dem Auge entfernt worden, kann das Auge mit Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser ausgespült werden.

(3) Prüfung von Aerosolen

19. Es wird empfohlen, alle als Pumpspray oder Aerosol vorliegenden Prüfchemikalien mittels Sprühstoß zu entnehmen, in einem Behälter aufzufangen und anschließend zu applizieren. Einzige Ausnahme sind Chemikalien in Aerosol-Druckbehältern, die aufgrund der Vaporisierung nicht aufgefangen werden können. In diesen Fällen sollte das Auge offen

gehalten und die Prüfchemikalie mit einem einzigen Sprühstoß etwa eine Sekunde lang aus 10 cm Entfernung ins Auge gesprüht werden. In Abhängigkeit vom Druck und vom Behälterinhalt kann dieser Abstand variieren. Es ist darauf zu achten, dass das Auge durch den Sprühdruck nicht verletzt wird. Unter Umständen muss das Risiko „mechanischer“ Augenschäden, die auf den Sprühdruck zurückzuführen sind, beurteilt werden.

20. Bei Aerosolen kann die Dosis geschätzt werden, indem der Test folgendermaßen simuliert wird: Die Chemikalie durch eine Öffnung in der Größe eines Kaninchenauges auf Wägebapier sprühen, wobei sich die Öffnung unmittelbar vor dem Papier befindet. Anhand der Gewichtszunahme des Papiers wird ein Näherungswert für die ins Auge gesprühte Menge ermittelt. Bei flüchtigen Chemikalien kann ein Schätzwert für die Dosis ermittelt werden, indem man einen Auffangbehälter vor und nach Entnahme der Prüfchemikalie wiegt.

Vorversuch (*In-vivo*-Test auf Augenreizung/-verätzung an einem einzigen Tier)

21. Es empfiehlt sich dringend, den *In-vivo*-Test zunächst nur an einem Tier durchzuführen (siehe Ergänzung zu dieser Prüfmethode: Eine sequenzielle Strategie für die Prüfung auf Augenreizung/-verätzung). Die Beobachtungen sollen ausreichen, um den Schweregrad und die Reversibilität der Wirkungen zu bestimmen, bevor ein Bestätigungstest an einem zweiten Tier durchgeführt wird.
22. Sofern das beschriebene Verfahren ergibt, dass der Stoff augenverätzend wirkt oder schwere Augenreizungen auslöst, sollen keine weiteren Prüfungen auf Augenreizung durchgeführt werden.

Bestätigungstest (*In-vivo*-Test auf augenreizende Wirkungen an zusätzlichen Tieren)

23. Wird im Vorversuch keine ätzende oder schwer augenreizende Wirkung beobachtet, sollte die Reizungsreaktion bzw. die negative Reaktion an bis zu zwei weiteren Tieren bestätigt werden. Ergibt der Vorversuch eine Reizwirkung, sollte der Bestätigungstest nach Möglichkeit als sequenzieller Versuch an einem Tier einem bestimmten Zeitpunkt und nicht durch gleichzeitige Exposition der zwei weiteren Tiere erfolgen. Der Test ist abzubrechen, wenn beim zweiten Tier Anzeichen einer Verätzung oder einer schweren Reizung festgestellt werden. Wenn die Ergebnisse beim zweiten Tier eine Bestimmung der Gefahrenklasse zulassen, sollten keine weiteren Tests durchgeführt werden.

Beobachtungszeitraum

24. Die Beobachtungszeit sollte so bemessen sein, dass das Ausmaß und die Reversibilität der festgestellten Wirkungen umfassend bewertet werden können. Allerdings sollte der Versuch abgebrochen werden, sobald das Tier starke Anzeichen von Leiden und Schmerzen zeigt (8). Um feststellen zu können, ob die Wirkungen reversibel sind, sollten die Tiere in der Regel während 21 Tagen nach Applikation der Prüfchemikalie beobachtet

werden. Bilden sich die Schäden vor Ablauf dieser 21 Tage zurück, sollte der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet werden.

Klinische Beobachtungen und Einstufung von Augenreaktionen

25. Die Augen sollten eine Stunde nach Applikation der Prüfchemikalie umfassend auf vorhandene bzw. nicht vorhandene Augenläsionen untersucht werden; danach mindestens eine Untersuchung täglich durchführen. In den ersten 3 Tagen sollten die Tiere mehrmals täglich untersucht werden, damit Entscheidungen, den Versuch zu beenden, zeitnah getroffen werden können. Versuchstiere sollten während der gesamten Studiendauer routinemäßig mindestens zweimal täglich, falls nötig auch häufiger, auf klinische Anzeichen von Schmerzen und/oder Leiden untersucht werden (z. B. wiederholtes Kratzen und Reiben am Auge, übermäßiges Blinzeln, übermäßig tränende Augen) (9) (10) (11), wobei zwischen den Beobachtungen mindestens 6 Stunden liegen sollten. Dies ist nötig, um i) Tiere angemessen auf Anzeichen von Schmerzen und Leiden zu untersuchen und fundierte Entscheidungen im Hinblick auf eine Erhöhung der Dosis von Analgetika treffen zu können, und ii) Tiere auf Anzeichen vorbestimmter humaner Endpunkte zu untersuchen, damit fundierte Entscheidungen darüber getroffen werden können, ob Tiere human getötet werden sollten, und damit solche Entscheidungen zeitnah getroffen werden können. Eine Anfärbung mit Fluorescein sollte routinemäßig erfolgen und gegebenenfalls sind als Hilfsmittel zum Nachweis und zur Messung von Augenschäden und zur Beurteilung, ob vorbestimmte Endpunktkriterien für ein humanes Töten erfüllt sind, eine Spaltlampe und ein Biomikroskop zu verwenden (z. B. bei der Beurteilung der Tiefe einer Schädigung im Falle einer Hornhautulzeration). Digitale Fotografien von beobachteten Schädigungen können zu Referenzzwecken und zur dauerhaften Dokumentation des Ausmaßes der Augenschädigung erfasst werden. Sobald aussagekräftige Informationen vorliegen, sollte der Versuch nicht länger als nötig fortgesetzt werden. Tiere mit starken Anzeichen von Schmerzen oder Leiden sollen unverzüglich human getötet werden, wobei die Chemikalie entsprechend einzustufen ist.
26. Bei Tieren mit folgenden Augenschädigungen nach Applikation der Prüfchemikalie ist eine humane Tötung angezeigt (siehe Tabelle 1 zur Beschreibung der Schädigungsgrade): Hornhautperforation oder signifikante Hornhautulzeration mit Staphylokokken; Blut in der vorderen Augenkammer; Hornhauttrübung Grad 4; fehlender Pupillenreflex (Irisreaktion Grad 2) während 72 Stunden; Ulzeration der Bindehaut; Nekrose der Bindehaut oder der Nickhaut oder Gewebdemarkierung. Diese Schäden sind im Allgemeinen irreversibel. Darüber hinaus wird empfohlen, die folgenden Augenschädigungen als humane Endpunkte zu definieren, bei denen Studien vor Ablauf des planmäßigen 21-tägigen Beobachtungszeitraums beendet werden sollten. Diese Schädigungen gelten als prädiktiv für schwere Reizungen oder Verätzungen und Schädigungen, bei denen davon ausgegangen werden muss, dass sie bis zum Ablauf des 21-tägigen Beobachtungszeitraums nicht vollständig abklingen: sehr tiefe Schädigung (z. B. eine

Hornhautulzeration bis in Schichten unterhalb der Stromaoberfläche), Zerstörung des Limbus zu mehr als 50 % (nachgewiesen durch ein Ausbleichen des Bindehautgewebes) und schwere Augeninfektion (eitriger Ausfluss). Eine Kombination von Vaskularisierung der Hornhautoberfläche (d. h. Pannus), sich nicht rückbildender Fluoresceinfärbung (basierend auf einer täglichen Untersuchung) und/oder einer ausbleibenden Reepithelisierung am 5. Tag nach Applikation der Prüfchemikalie könnte ebenfalls als potenziell zweckdienliches Kriterium für die klinische Entscheidung über eine vorzeitige Beendigung der Studie angesehen werden. Einzeln betrachtet sind diese Ergebnisse jedoch nicht ausreichend, um eine vorzeitige Beendigung der Studie zu rechtfertigen. Sobald schwerwiegende Auswirkungen auf die Augen festgestellt werden, sollten ein behandelnder Tierarzt oder ein qualifizierter Labortierarzt oder im Nachweis klinischer Schädigungen geschultes Laborpersonal zur Notwendigkeit einer klinischen Untersuchung zur Feststellung, ob die Kombination dieser Auswirkungen eine vorzeitige Beendigung der Studie rechtfertigt, konsultiert werden. Der jeweilige Grad der Augenreaktion (Bindehaut, Hornhaut und Iris) ist 1, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation der Prüfchemikalie zu ermitteln und zu dokumentieren (Tabelle 1). Tiere, bei denen keine Augenschädigungen auftreten, dürfen frühestens 3 Tage nach der Behandlung getötet werden. Bei leichten bis mäßigen Augenschädigungen sollten die Tiere bis zum Abklingen der Symptome bzw. für die Dauer von 21 Tagen beobachtet werden; erst danach wird die Studie abgeschlossen. Untersuchungen sollen mindestens nach 1 Stunde, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden sowie am 7., 14. und 21. Tag durchgeführt und dokumentiert werden, um den Status der Schädigungen zu ermitteln und zu klären, ob sie reversibel oder irreversibel sind. Erforderlichenfalls sollten häufigere Untersuchungen durchgeführt werden, um zu entscheiden, ob das Versuchstier aus Tierschutzgründen human getötet oder aufgrund von negativen Ergebnissen aus dem Versuch genommen werden sollte.

27. Der jeweilige Grad der Augenschädigung (vgl. Tabelle 1) sollte für jede Untersuchung erfasst werden. Etwaige weitere Augenschädigungen (z. B. Pannus, Verfärbungen, Veränderungen in der vorderen Augenkammer) oder negative systemische Wirkungen sind ebenfalls zu dokumentieren.
28. Als Hilfsmittel können bei den Untersuchungen Binokularlupen, Handspaltlampen, Biomikroskope und andere geeignete Geräte benutzt werden. Nach Aufzeichnung der Beobachtungen nach 24 Stunden können die Augen außerdem mit Fluorescein weiter untersucht werden.
29. Die Bewertung von Augenreaktionen ist zwangsläufig subjektiv. Um die Einstufung von Augenreaktionen stärker zu vereinheitlichen und den Prüflabors und allen an den Versuchen und an der Interpretation der Versuchsergebnisse Beteiligten die Arbeit zu erleichtern, müssen die Prüfer im Umgang mit der Bewertungsskala geschult werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Ergebnisauswertung

30. Die Bewertung der Augenreizung sollte anhand der Art und des Schweregrads der Schädigung und deren Reversibilität bzw. Irreversibilität vorgenommen werden. Die jeweils ermittelten Schweregrade stellen keinen alleingültigen Maßstab für die reizenden Eigenschaften einer Chemikalie dar, denn es werden auch andere Wirkungen der Prüfchemikalie beurteilt. Vielmehr sollten die einzelnen Graduierungswerte als Referenzwerte betrachtet werden, die nur dann sinnvoll sind, wenn sämtliche Beobachtungen genau erfasst und evaluiert werden.

Prüfbericht

31. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Begründung für den *In-vivo*-Test: WoE-Analyse von Daten aus früheren Versuchen unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der sequenziellen Prüfstrategie:

- Beschreibung aller einschlägigen Daten aus früheren Versuchen;
- Daten, die auf den einzelnen Stufen der Prüfstrategie erhoben wurden;
- Beschreibung der durchgeführten *In-vitro*-Tests mit Einzelheiten zu den angewandten Verfahren sowie zu den Ergebnissen für Prüf-/Referenzchemikalien;
- Beschreibung der durchgeführten *In-vivo*-Tests auf Hautreizung/-verätzung mit Einzelheiten zu den Ergebnissen;
- WoE-Analyse als Grundlage für die Durchführung einer *In-vivo*-Studie.

Prüfchemikalie:

- Angaben zur Identität (z. B. chemische Bezeichnung und, sofern vorhanden, CAS-Nummer, Reinheit, bekannte Verunreinigungen, Bezugsquelle, Chargennummer);
- physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Flüchtigkeit, Löslichkeit, Stabilität, Reaktivität mit Wasser);
- bei Gemischen: Angabe der einzelnen Bestandteile, einschließlich Angaben zur Identität (z. B. chemische Bezeichnungen und, sofern vorhanden, CAS-Nummern) und den Konzentrationen;
- verwendete Dosis.

Vehikel:

- Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;
- Begründung der Auswahl des Vehikels.

Versuchstiere:

- Spezies/Stamm, Begründung des Verzichts auf Albino-Kaninchen zugunsten anderer Tiere;

- Alter der Tiere zu Beginn der Studie;
- Anzahl der Versuchstiere pro Geschlecht in den Prüf- und Kontrollgruppen (falls erforderlich);
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn und -ende;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Ernährung usw.

Anästhetika und Analgetika

- Dosen und Zeitpunkte, zu denen topische Anästhetika und systemische Analgetika verabreicht wurden;
- sofern lokale Anästhetika eingesetzt wurden, Angaben zur Identität, Reinheit, Art und möglichen Wechselwirkungen mit der Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

- Beschreibung der Methode zur Bewertung von Reizungen zu den einzelnen Beobachtungszeiten (z. B. Handspaltlampe, Biomikroskop, Fluorescein);
- tabellarische Erfassung der Daten über Reizungs-/Verätzungsreaktionen zu allen Messzeitpunkten und für jedes einzelne Versuchstier bis hin zum Ausscheiden des Tiers aus dem Versuch;
- ausführliche Beschreibung von Art und Schweregrad der festgestellten Reizung bzw. Verätzung;
- Beschreibung aller anderen im Auge festgestellten Schädigungen (z. B. Vaskularisierung, Pannus, Verklebungen, Verfärbungen);
- Beschreibung sonstiger lokaler und systemischer Folgen außerhalb des Auges, Dokumentation klinischer Anzeichen von Schmerzen und Leiden, digitale Fotografien und ggf. vorliegende histopathologischer Befunde.

Diskussion der Ergebnisse.

Interpretation der Ergebnisse

32. Eine Extrapolation der Ergebnisse von Untersuchungen auf Augenreizungen an Labortieren auf den Menschen ist nur bedingt möglich. Oftmals reagiert das Albino-Kaninchen empfindlicher als der Mensch auf Stoffe mit augenreizenden oder -verätzenden Eigenschaften.
33. Bei der Interpretation von Daten ist darauf zu achten, dass Reizungen aufgrund einer sekundären Infektion nicht berücksichtigt werden.

LITERATURHINWEISE

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), *The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard*, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410-429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), *Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies*, *Food Chem. Toxicol.* 35, 159-164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), *A general approach for evaluating stepwise testing strategies* ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), *Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals*, *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (5) Neun, D.J. (1993), *Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH*, *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227 - 231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), *The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team*, *Toxicology in vitro* 12, 483-524.
- (7) Kapitel B.4 dieses Anhangs, *Akute Hautreizung/-verätzung*.
- (8) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, Nr. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), *Animal pain: evaluation and control*, *Lab Animal*, Mai/Juni, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*, Washington, DC: The National Academies Press.
- (12) ICCVAM (2010), *ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing*, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle

Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.
<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>

- (13) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro-Prüfung auf hautätzende Wirkung: TER-Test (Transcutaneous Electrical Resistance Test)*.
- (14) Kapitel B.40 bis dieses Anhangs, *In-vitro-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Test mit einem menschlichen Hautmodell*.
- (15) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Abschnitt 4, OECD Paris.
- (16) Kapitel B.47 dieses Anhangs, Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut zwecks Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (17) Kapitel B.48 dieses Anhangs, Test am isolierten Hühnerauge zur Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Vierte überarbeitete Ausgabe, New York und Genf: United Nations Publications.
- (20) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Amtsblatt der Europäischen Union L 353, S. 1-1355.
- (21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Kapitel R.7a: Endpoint specific guidance.
http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

TABELLE 1 – EINSTUFUNG VON AUGENSCHÄDIGUNGEN

<u>Cornea</u>	<u>Grad</u>
Trübung: Trübungsgrad (für die Auswertung wird der am stärksten betroffene Bereich genommen)*	
Keine Ulzeration oder Trübung.....	0
Punktförmige oder diffuse Trübungsbereiche (ohne leichte Trübung des normalen Glanzes); Einzelheiten der Iris deutlich erkennbar	1
Leicht erkennbarer durchlässiger Bereich, Einzelheiten der Iris etwas verschattet	2
Perlmutterartige Bereiche, keine Einzelheiten der Iris sichtbar, Größe der Pupille kaum erkennbar.....	3
Trübe Hornhaut; Iris aufgrund der Trübung nicht erkennbar	4
Höchstmögliche Punktzahl: 4	
* Die Größe des von der Hornhauttrübung betroffenen Areals sollte dokumentiert werden.	
<u>Iris</u>	
Normal.....	0
Deutlich vertiefte Rugae, Kongestion, Schwellung, mäßige circumcorneale Hyperämie oder Injektion; Iris reagiert auf Licht (träge Reaktion ist positiv).....	1
Blutungen, großflächige Zerstörung, keine Reaktion auf Licht	2
Höchstmögliche Punktzahl: 2	
<u>Conjunctivae</u>	
Rötung (der Augenlidbindehaut und der Augapfelbindehaut; ohne Hornhaut und Iris)	
Normal.....	0
Einige Blutgefäße zeigen Hyperämie (Injektion)	1
Diffuse karmesinrote Farbe; einzelne Gefäße nur schwer erkennbar.....	2
Diffuse dunkelrote Verfärbung.....	3
Höchstmögliche Punktzahl: 3	
<u>Chemosis</u>	
Schwellung (der Augenlider und/oder Nickhäute)	
Normal.....	0
Über dem Normalen liegende Schwellung.....	1
Deutliche Schwellung mit partieller Auswärtskehrung der Lider	2

Schwellung mit etwa halbgeschlossenen Lidern 3
Schwellung mit mehr als halbgeschlossenen Lidern 4
Höchstmögliche Punktzahl: 4

Anlage

DEFINITIONEN

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

Evidenzbasierte Analyse (*Weight-of-Evidence*, WoE): der Prozess der Prüfung der Stärken und Schwächen einer Datensammlung als Grundlage für eine Schlussfolgerung, zu der es auf Basis von Einzeldaten möglicherweise nicht gekommen wäre.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Saure/alkalische Reserve: Bei sauren Zubereitungen: zum Erreichen eines bestimmten pH-Werts erforderliche Menge (in g) Natronlauge/100 g Zubereitung. Bei alkalischen Zubereitungen: zum Erreichen eines bestimmten pH-Werts erforderliche Menge (in g) Natronlauge, die der Menge (in g) Schwefelsäure/100 g Zubereitung entspricht, (Young *et al.* 1988).

Stoffe ohne Reizwirkung: Stoffe, die nicht als augenreizende Stoffe der EPA-Kategorien I, II oder III eingestuft sind, oder augenreizende Stoffe der GHS-Kategorien 1, 2, 2A oder 2B oder der EU-Kategorien 1 oder 2 (17) (18) (19).

Stoff mit augenätzender Wirkung: a) eine Chemikalie, die eine irreversible Gewebeschädigung am Auge verursacht; b) Chemikalien, die als augenreizende Stoffe der GHS-Kategorie 1 oder als augenreizende Stoffe der EPA-Kategorie I oder der EU-Kategorie 1 eingestuft sind (17) (18) (19).

Stoff mit augenreizender Wirkung: a) eine Chemikalie, die eine reversible Veränderung im Auge hervorruft; b) Chemikalien, die als augenreizende Stoffe der EPA-Kategorien II oder III oder als augenreizende Stoffe der GHS-Kategorien 2, 2A oder 2B oder der EU-Kategorie 2 eingestuft sind (17) (18) (19).

Stoff mit schwer augenreizender Wirkung: a) eine Chemikalie, die eine Gewebeschädigung im Auge verursacht, die nicht innerhalb von 21 Tagen nach Applikation ausheilt, oder eine massive Verschlechterung des Sehvermögens auslöst; b) Chemikalien, die als augenreizende Stoffe der GHS-Kategorie 1 oder als augenreizende Stoffe der EPA-Kategorie I oder der EU-Kategorie 1 eingestuft sind (17) (18) (19).

Stufenweiser Ansatz: eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Analyseansatz (*Weight-of-Evidence*, WoE) vorgegangen wird, um festzustellen, ob genügend Informationen für eine Gefahrenklassifizierung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das

Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen zugeordnet werden kann, sind keine weiteren Testungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Klassifizierung möglich ist.

ERGÄNZUNG ZUR PRÜFMETHODE B.5¹**SEQUENZIELLE STRATEGIE FÜR DIE PRÜFUNG AUF AUGENREIZUNGEN
UNDAUGENVERÄTZUNGEN****Allgemeine Überlegungen**

1. Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes muss die unnötige Verwendung von Versuchstieren verhindert und die Durchführung von Versuchen, die bei den Tieren wahrscheinlich schwere Reaktionen hervorrufen, auf ein Mindestmaß beschränkt werden. Bevor ein *In-vivo*-Test ins Auge gefasst werden kann, sollten zunächst alle einschlägigen Informationen über die potenziell augenreizenden/-verätzenden Wirkungen einer Chemikalie bewertet werden. Möglicherweise liegen bereits genügend Kriterien (*Evidence*) für die Einstufung einer Prüfchemikalie aufgrund ihres Augenreizungs-/verätzungspotenzials vor, sodass sich Versuche an Labortieren erübrigen. Folglich schränken WoE-Analysen bereits vorliegender Daten und die Anwendung einer sequenziellen Prüfstrategie die Notwendigkeit von *In-vivo*-Tests deutlich ein. Dies gilt umso mehr, wenn davon auszugehen ist, dass die Chemikalie schwere Reaktionen hervorruft.
2. Zur Beurteilung bereits vorhandener Informationen über die augenreizenden/-verätzenden Wirkungen von Chemikalien sollte das Instrument der evidenzbasierten Analyse herangezogen werden. Ausgehend davon ist zu entscheiden, ob als Beitrag zur Charakterisierung dieses Potenzials zusätzliche Studien, bei denen es sich nicht um *In-vivo*-Augenuntersuchungen handelt, durchgeführt werden sollten. Sofern weitere Studien durchgeführt werden müssen, empfiehlt es sich, zur Generierung sachdienlicher Versuchsdaten die sequenzielle Prüfstrategie anzuwenden. Bei noch nicht geprüften Stoffen soll die sequenzielle Prüfstrategie genutzt werden, um die Datensätze zu generieren, die für die Beurteilung des augenätzenden/-reizenden Potenzials benötigt werden. Die ursprüngliche in dieser Ergänzung beschriebene Prüfstrategie wurde in einem OECD-Workshops (1) entwickelt. Sie wurde im Rahmen des „*Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*“ bestätigt und weiter ausgebaut, das im November 1998 von den Teilnehmern der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien gebilligt (2) und 2011 von einer OECD-Expertengruppe überarbeitet wurde.

¹ Zur Anwendung einer integrierten Strategie für Augenreizungsprüfungen im Rahmen der REACH-Verordnung vgl. auch die *ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment*, Kapitel R.7a: *Endpoint specific guidance* http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

3. Diese Prüfstrategie ist zwar nicht integraler Bestandteil der Prüfmethode B.5, wird aber zur Ermittlung augenreizender/-verätzender Merkmale empfohlen. Dieser Ansatz entspricht sowohl der besten Praxis als auch dem ethischen Richtwert für Augenreizungs/-verätzungsprüfungen am lebenden Tier. Die Prüfmethode ist nicht nur eine Anleitung für die Durchführung des *In-vivo*-Tests, sondern beschreibt auch die Faktoren, die vor der Durchführung eines solchen Versuchs überprüft werden sollten. Die sequenzielle Prüfstrategie liefert einen Ansatz für die Bewertung bereits vorhandener Daten über die augenreizenden/-verätzenden Eigenschaften von Chemikalien und einen stufenweisen Ansatz für die Generierung sachdienlicher Daten über Chemikalien, die im Rahmen zusätzlicher Studien untersucht werden müssen bzw. noch gar nicht untersucht wurden. Die Strategie sieht die Durchführung validierter und anerkannter *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Tests vor, in bestimmten Fällen gefolgt von Untersuchungen nach Prüfmethode B.4 (3) (4).

Beschreibung der stufenweisen Prüfstrategie

4. Alle vorhandenen Informationen sollten vor der Durchführung von Versuchen im Rahmen der sequenziellen Prüfstrategie (Fließbild) bewertet werden, um die Notwendigkeit von *In-vivo*-Augentests zu klären. Auch wenn wichtige Informationen aus der Beurteilung einzelner Parameter (z. B. extreme pH-Werte) gewonnen werden können, sollten die bereits vorliegenden Angaben in ihrer Gesamtheit betrachtet werden. Alle relevanten Daten über die Wirkungen der betreffenden Chemikalie und Struktur verwandter Verbindungen sollten mittels WoE-Analyse bewertet werden, und die Entscheidung sollte begründet werden. Dabei sollten bereits vorliegende Angaben zur Wirkung der Chemikalie auf Mensch und Tier im Vordergrund stehen, gefolgt von den Ergebnissen von *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Tests. *In-vivo*-Untersuchungen mit Chemikalien mit Ätzwirkung sollten nach Möglichkeit immer vermieden werden. Folgende Faktoren werden bei der Prüfstrategie berücksichtigt:
5. Beurteilung bereits vorliegender Daten zur Wirkung der Chemikalie auf Mensch und/oder Tier und/oder mit validierten und international anerkannten Methoden gewonnener *In-vitro*-Daten (Stufe 1). Zunächst sollten vorhandene Humandaten, z. B. aus klinischen Studien oder Studien zur Exposition am Arbeitsplatz, Fallberichte und/oder Ergebnisse von Tierversuchen (Untersuchungen am Auge) und/oder mit validierten und international anerkannten Methoden gewonnene *In-vitro*-Daten zu augenreizenden/-verätzenden Wirkungen bewertet werden, denn sie liefern Hinweise, die unmittelbar die Wirkungen auf das Auge betreffen. Danach sollten vorhandene Daten aus Untersuchungen an Menschen und/oder Tieren zu Hautverätzungen/-reizungen und/oder mit validierten und international anerkannten Methoden gewonnene *In-vitro*-Daten zu hautätzenden Wirkungen bewertet werden. Chemikalien mit bekannter augenverätzender oder schwer augenreizender Wirkung sollen nicht in die Augen von Tieren geträufelt werden. Dies gilt ebenso für Chemikalien, die Hautreizungen oder -verätzungen hervorrufen. Alle diese Chemikalien

sollten ebenfalls als augenverätzende und/oder -reizende Stoffe betrachtet werden. Auch mit Chemikalien, bei denen in früheren Augenuntersuchungen hinreichend nachgewiesen wurde, dass sie weder Verätzungen noch Reizungen hervorrufen, sollten keine *In-vivo*-Studien am Auge durchgeführt werden.

6. Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*Structure-Activity Relationships*, SAR) (Stufe 2). Die gegebenenfalls vorhandenen Ergebnisse von Untersuchungen an strukturell verwandten Chemikalien sollten berücksichtigt werden. Liegen genügend Daten über das augenverätzende/-reizende Potenzial von strukturell verwandten Stoffen oder Gemischen aus diesen Stoffen aus Untersuchungen an Menschen und/oder Tieren vor, kann davon ausgegangen werden, dass die zu beurteilende Prüfchemikalie die gleichen Reaktionen hervorrufen wird. In diesen Fällen braucht die Chemikalie nicht getestet zu werden. Für die Zwecke der sequenziellen Prüfstrategie reichen negative Daten aus Untersuchungen an strukturell verwandten Stoffen oder Gemischen als Nachweis für ein Nichtvorhandensein augenverätzender/-reizender Wirkungen nicht aus. Zur Ermittlung des Verätzungs- und Reizungspotenzials in Bezug auf die Haut und die Augen sollten validierte und anerkannte SAR-Verfahren herangezogen werden.
7. Physikalisch-chemische Eigenschaften und chemische Reaktivität (Stufe 3). Stoffe mit extremen pH-Werten ($\leq 2,0$ bzw. $\geq 11,5$) können starke lokale Reaktionen hervorrufen. Gilt ein extremer pH-Wert als Anhaltspunkt für die augenverätzende oder -reizende Wirkung einer Chemikalie, so kann deren saure/alkalische Reserve (Pufferkapazität) ebenfalls berücksichtigt werden (5) (6) (7). Lässt die Pufferkapazität darauf schließen, dass eine Chemikalie möglicherweise keine augenverätzende Wirkung hat (d. h. Chemikalien mit extremem pH-Wert und geringer saurer/alkalischer Reserve), sollten weitere Prüfungen zur Bestätigung dieser Vermutung durchgeführt werden. Dafür eignen sich validierte und anerkannte *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests (siehe Punkt 10).
8. Einbeziehung anderer vorhandener Informationen (Stufe 4). In dieser Phase sollen alle verfügbaren Informationen über die systemische Toxizität bei Applikation auf die Haut bewertet werden. Die akute dermale Toxizität der Prüfchemikalie sollte ebenfalls beurteilt werden. Hat sich die Prüfchemikalie bei Hautkontakt als sehr giftig erwiesen, braucht sie nicht am Auge getestet zu werden. Auch wenn nicht unbedingt ein Zusammenhang zwischen akuter dermaler Toxizität und Augenreizung/-verätzung besteht, kann davon ausgegangen werden, dass ein Stoff, der bei Hautapplikation sehr giftig ist, auch beim Einträufeln in das Auge eine starke Toxizität aufweist. Diese Daten können auch zwischen den Stufen 2 und 3 bewertet werden.
9. Bewertung des Hautverätzungspotenzials der Chemikalie, sofern auch unter gesetzgeberischen Aspekten erforderlich (Stufe 5). Zunächst sollte das Potenzial zur Hautverätzung und starken Hautreizung nach Prüfmethode B.4 (4) und der zugehörigen Ergänzung (8) bewertet werden, auch anhand der validierten und international anerkannten *In-vitro*-Tests auf hautverätzende Wirkung (9) (10) (11). Wird der Nachweis erbracht, dass

die Chemikalie Verätzungen oder schwere Hautreizungen verursacht, so kann sie auch als Chemikalie mit augenverätzenden oder stark augenreizenden Eigenschaften betrachtet werden. In diesem Falle sind keine weiteren Tests erforderlich. Verursacht die Chemikalie keine Verätzung oder starke Reizung der Haut, sollte ein *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Augentest durchgeführt werden.

10. Ergebnisse von *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests (Stufe 6). Chemikalien, deren verätzende oder stark reizende Eigenschaften in validierten und international anerkannten, auf die Ermittlung der Augenverätzung/-reizung ausgerichteten *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests (12) (13) nachgewiesen wurden, müssen nicht an Tieren getestet zu werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanzen *in vivo* vergleichbar schwere Wirkungen hervorrufen werden. Stehen validierte und anerkannte *In-vitro*-/*Ex-vivo*-Tests nicht zur Verfügung, sollte die Stufe 6 übersprungen und es sollte direkt zu Stufe 7 übergegangen werden.
11. *In-vivo*-Test an Kaninchen (Stufen 7 und 8). Vor dem eigentlichen *In-vivo*-Augentest sollte zunächst ein Vorversuch an nur einem Tier durchgeführt werden. Es sollten keine weiteren Tests erfolgen, wenn der Vorversuch ergibt, dass die Chemikalie schwere Augenreizungen oder -verätzungen hervorruft. Liefert der Vorversuch keine Anhaltspunkte für eine ätzende Wirkung oder schwere Reizungen, wird ein Bestätigungstest an zwei weiteren Tieren durchgeführt. Abhängig von den Ergebnissen des Bestätigungstests müssen gegebenenfalls weitere Tests durchgeführt werden. [siehe Prüfmethode B.5]

PRÜF-UND BEWERTUNGSSTRATEGIE: AUGENREIZUNG/-VERÄTZUNG

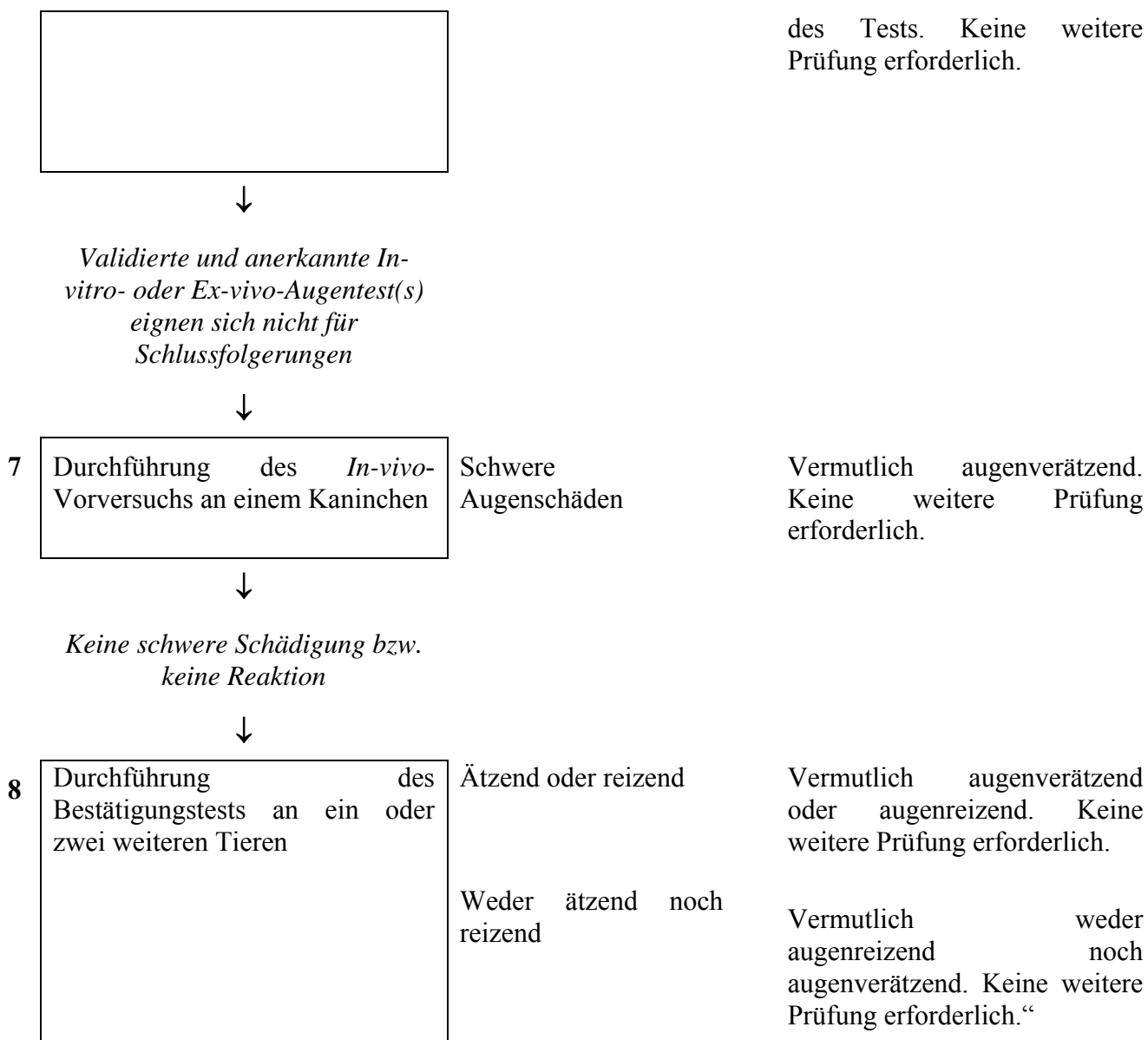
<u>Stufe</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Schlussfolgerung</u>	
1	Bereits vorliegende Daten aus Untersuchungen am Menschen und/oder an Tieren und/oder <i>In-vitro</i> -Daten aus validierten und international anerkannten Methoden belegen Wirkungen auf das Auge	Schwere Augenschäden	Apikaler Endpunkt; gilt als augenverätzend. Keine Prüfung erforderlich.
		Augenreizend	Apikaler Endpunkt; gilt als augenreizend. Keine Prüfung erforderlich.
		Nicht augenverätzend/nicht augenreizend	Apikaler Endpunkt; gilt als nicht augenverätzend oder -reizend. Keine Prüfung erforderlich.
	Bereits vorliegende Daten aus Untersuchungen am Menschen und/oder an Tieren und/oder <i>In-vitro</i> -Daten aus validierten und international anerkannten Methoden belegen ätzende Wirkungen auf die Haut	Hautverätzend	Vermutlich augenverätzend. Keine Prüfung erforderlich.
	Bereits vorliegende Daten aus Untersuchungen am Menschen und/oder an Tieren und/oder <i>In-vitro</i> -Daten aus validierten und international anerkannten Methoden belegen schwere hautreizende Wirkungen	Stark hautreizend	Vermutlich augenreizend. Keine Prüfung erforderlich.



*Keine Informationen vorhanden
bzw. vorhandene Informationen
nicht schlüssig*



5	Versuch zur Bewertung des Hautverätzungspotenzials nach Prüfstrategie in Kapitel B.4 dieses Anhangs, sofern auch unter gesetzgeberischen Aspekten erforderlich	Verätzung bzw. schwere Reizung	Vermutlich augenverätzend. Keine weitere Prüfung erforderlich.
<p>↓</p> <p><i>Chemikalie ruft keine Hautverätzung oder schwere Hautreizung hervor</i></p> <p>↓</p>			
6	Durchführung validierter und anerkannter <i>In-vitro</i> - oder <i>Ex-vivo</i> - Augentest(s)	Verätzung bzw. schwere Reizung	Vermutlich augenverätzend oder schwer augenreizend, vorausgesetzt, der durchgeführte Test ist zur Ermittlung ätzender/schwer reizender Stoffe geeignet und die Chemikalie fällt in den Anwendungsbereich des Tests. Keine weitere Prüfung erforderlich.
		Reizung	Vermutlich augenreizend, vorausgesetzt, der/die durchgeführte(n) Test(s) ist (sind) zur Ermittlung ätzender, schwer reizender und reizender Stoffe geeignet und Chemikalie fällt in den Anwendungsbereich des/der Tests. Keine weitere Prüfung erforderlich.
		Keine Reizung	Vermutlich nicht augenreizend, vorausgesetzt, der/die durchgeführte(n) Test(s) ist (sind) zur Ermittlung nichtreizender Stoffe sowie zur Unterscheidung von reizenden, schwer reizenden oder augenverätzenden Stoffen geeignet und die Chemikalie fällt in den Anwendungsbereich



LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Schweden, 22.-24. Januar 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, bestätigt auf der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der

Arbeitsgruppe Chemikalien, November 1998
(<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. 1999. *A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies*. ATLA 27, 161-177.
- (4) Kapitel B.4 dieses Anhangs, Akute Hautreizung/-verätzung.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) *Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals*. Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) *The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity*. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro* 12, 483-524.
- (7) Neun, D.J. (1993) *Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH*. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227-231.
- (8) Ergänzung zu Kapitel B.4 dieses Anhangs, Sequenzielle Prüfstrategie für Augenreizungen und -verätzungen.
- (9) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: TER-Test (*Transcutaneous Electrical Resistance Test*).
- (10) Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Test mit einem menschlichen Hautmodell.
- (11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD-Prüfrichtlinie für Chemikalienprüfungen, Abschnitt 4, OECD, Paris.
- (12) Kapitel B.47 dieses Anhangs, Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut zwecks Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.
- (13) Kapitel B.48 dieses Anhangs, Test am isolierten Hühnerauge zur Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern.

(3) In Teil B erhält Kapitel B.10 folgende Fassung:

„B.10 *In-vitro*-Test auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 473 (2016). Sie ist Teil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Ein neu erstelltes OECD-Dokument enthält kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen dieser Prüfrichtlinien (1).
2. Der *In-vitro*-Test auf Chromosomenaberrationen dient dem Nachweis von Chemikalien, die in Säugerzellkulturen strukturelle Chromosomenaberrationen auslösen (2) (3) (4). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei *In-vitro*-Tests auf Chromosomenaberrationen könnte es zu Polyploidie (einschließlich Endoreduplikation) kommen. Aneugene können zwar eine Polyploidie hervorrufen, die an sich jedoch kein Hinweis auf ein aneugenisches Potenzial ist und möglicherweise nur auf Störungen des Zellzyklus oder Zytotoxizität hinweist (5). Dieser Test dient nicht der Messung der Aneuploidie; dazu wird ein *In-vitro*-Mikrokerntest (6) empfohlen.
3. Für den *In-vitro*-Chromosomenaberrationstest eignen sich Kulturen von etablierten Zelllinien oder primäre Zellkulturen vom Menschen oder von Nagetieren. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt ihrer Wachstumsfähigkeit in Kultur, der Karyotypstabilität (einschließlich Chromosomenzahl) und der spontanen Häufigkeit von Chromosomenaberrationen ausgewählt (7). Die bisher vorhandenen Daten lassen zwar keine verbindlichen Empfehlungen zu, legen jedoch nahe, dass bei der Bewertung des Gefahrenpotenzials chemischer Stoffe der *p53*-Status, die genetische (Karyotyp-) Stabilität, die DNA-Reparaturfähigkeit und die Herkunft (Nagetier/Mensch) der für die Tests ausgewählten Zellen berücksichtigt werden müssen. Anwenden dieser Prüfmethode wird daher empfohlen, beim Nachweis der Entwicklung von Chromosomenaberrationen den Einfluss dieser und anderer Zellcharakteristika auf die Leistungsfähigkeit von Zelllinien zu berücksichtigen, da sich die wissenschaftlichen Kenntnisse auf diesem Gebiet ständig weiterentwickeln.
4. Für Definitionen siehe Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND GRENZEN

5. *In vitro* durchgeführte Versuche setzen in der Regel eine exogene Metabolisierung voraus, es sei denn, die Zellen sind in Bezug auf die Prüfchemikalie metabolisch kompetent. Mit

exogener Metabolisierung lassen sich die *In-vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, die zu künstlich herbeigeführten Positivergebnissen führen könnten, d. h. zu Chromosomenschäden, die nicht von einer direkten Interaktion zwischen den Prüfchemikalien und den Chromosomen herrühren; zu solchen Bedingungen gehören Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität (8) (9) (10), eine Interaktion mit einzelnen Komponenten des Mediums (11) (12) oder eine hochgradige Zytotoxizität (13) (14) (15) (16).

6. Dieser Test dient der Feststellung von Chromosomenaberrationen infolge klastogener Vorgänge. Zur Analyse von Chromosomenaberrationen sollten Metaphasenzellen verwendet werden. Deshalb ist es wichtig, dass Zellen sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Kulturen die Mitose erreichen. Für hergestellte Nanomaterialien sind möglicherweise spezielle Anpassungen dieser Prüfmethode erforderlich, die an dieser Stelle jedoch nicht beschrieben werden.
7. Bevor die Prüfmethode auf ein Gemisch angewendet wird, um Daten für regulatorische Zwecke zu generieren, sollte geprüft werden, ob, und, falls ja, warum sie diesbezüglich zweckdienliche Ergebnisse liefert. Diese Überlegungen erübrigen sich, wenn die Durchführung von Tests für das Gemisch gesetzlich vorgeschrieben ist.

TESTPRINZIP

8. Die Behandlung der Zellkulturen (humane Zellen oder andere Säugetierzellen) mit der Prüfchemikalie erfolgt mit und ohne exogene Metabolisierung, es sei denn, es werden Zellen verwendet, die über eine entsprechende Stoffwechselkompetenz verfügen (siehe Nummer 13). In bestimmten vorab festgelegten Zeitabständen werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z. B. Colcemid oder Colchicin) behandelt, geerntet und angefärbt und die Metaphasenzellen anschließend mikroskopisch auf Chromatidentyp- und Chromosomentypaberrationen untersucht.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorbereitungen

Zellen

9. Es können verschiedene Zelllinien (z. B. Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO), V79-Lungenzellen des chinesischen Hamsters (CHL), TK6-Lungenzellen des chinesischen Hamsters (CHL)/IU) oder primäre Zellkulturen, auch menschliche Zellen oder Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen oder anderen Säugern, verwendet werden (7). Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein. Wenn Primärzellen verwendet werden, sollten im Interesse des Tierschutzes Primärzellen

menschlichen Ursprungs in Betracht gezogen werden, soweit dies möglich ist und die Entnahme nach humanethischen Grundsätzen und Regeln erfolgt. Lymphozyten aus peripherem Humanblut sollte jungen (etwa 18-35 Jahre alten) Personen entnommen werden, die Nichtraucher sind, bei denen keine Krankheit festgestellt wird und die kürzlich nicht in einem Umfang mit gentoxischen Substanzen (z. B. Chemikalien, ionisierende Strahlungen) in Berührung kamen, der die Hintergrundinzidenz von Chromosomenaberrationen erhöhen würde. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Hintergrundinzidenz von Chromosomenaberrationen niedrig und konstant ist. Die Baseline-Inzidenz von Chromosomenaberrationen steigt mit dem Alter, wobei dieser Trend bei Frauen ausgeprägter ist als bei Männern (17) (18). Wenn Zellen mehrerer Spender zwecks Verwendung gepoolt werden, ist die Zahl der Spender anzugeben. Es muss nachgewiesen werden, dass sich die Zellen zwischen Behandlungsbeginn und Zellentnahme geteilt haben. Die Zellkulturen werden in einer Phase exponentiellen Wachstums gehalten (Zelllinien) oder zur Teilung angeregt (primäre Lymphozytenkulturen), um Zellen in unterschiedlichen Zyklusstadien zu exponieren, da die Empfindlichkeit der Zellstadien gegenüber den Prüfchemikalien möglicherweise nicht bekannt ist. Die Primärzellen, die mit mitogenen Wirkstoffen zur Teilung angeregt werden müssen, werden in der Regel während der Behandlung mit der Prüfchemikalie nicht weiter synchronisiert (z. B. humane Lymphozyten nach einer 48-stündigen mitogenen Stimulation). Die Verwendung synchronisierter Zellen während der Behandlung wird nicht empfohlen, kann jedoch zulässig sein, sofern gerechtfertigt.

Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

10. Die Kultivierung erfordert geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, ggf. befeuchtete Atmosphäre mit einer CO₂-Konzentration von 5 %, Inkubationstemperatur von 37 °C). Zelllinien sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und *Mycoplasma*-Verunreinigung zu überprüfen (7) (19); bei Verunreinigung oder bei veränderter modaler Chromosomenzahl sollten Zellen nicht verwendet werden. Die normale Dauer des Zellzyklus sollte bei den gewählten Zelllinien oder den im Prüflabor verwendeten primären Kulturen bekannt sein und mit veröffentlichten Zellcharakteristiken übereinstimmen (20).

Vorbereitung der Kulturen

11. Zelllinien: Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Zellen in Suspensionen oder Monolayern bis zum Zeitpunkt ihrer Ernte weiterhin exponentiell wachsen (z. B. sollte eine Konfluenz bei in Monolayern gezüchteten Zellen vermieden werden).
12. Lymphozyten: Mit einem Antikoagulans (z. B. Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten werden einem Kulturmedium beigegeben (z. B. im Fall von humanen Lymphozyten für die Dauer von 48 Stunden), das ein Mitogen (z. B.

Phytohämagglutinin (PHA) bei humanen Lymphozyten) enthält, um eine Zellteilung vor der Behandlung mit der Prüfchemikalie herbeizuführen.

Stoffwechselaktivierung

13. Bei Zellen mit unzulänglicher endogener Stoffwechselkapazität sollten exogene metabolisierende Systeme verwendet werden. Das gängigste und, sofern nicht anders begründet, standardmäßig empfohlene System, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (21) (22) (23) oder einer Kombination aus Phenobarbiton und β -Naphthoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29) vorbehandelt wurde. Letztere Kombination verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe (30) und hat sich für die Induktion von Multifunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (24) (25) (26) (28). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 2 % v/v verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Verwendung von Produkten, die den Mitoseindex senken, insbesondere Komplexbildner für Calcium (31), sollten während der Behandlung vermieden werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der Klasse der geprüften Chemikalien abhängig.

Vorbereitung der Prüfchemikalie

14. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden (siehe Nummer 23). Flüssige Prüfchemikalien können dem Versuchssystem vor der Behandlung direkt zugegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind durch entsprechende Modifikationen der Standardprotokolle zu prüfen, z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (32) (33) (34). Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Chemikalie ist bei Lagerung nachweislich stabil.

Prüfbedingungen

Lösungsmittel

15. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalie gewährleistet ist, ohne dass die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt wird, z. B. durch Veränderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen, Behinderung des Metabolisierungssystems. Es ist empfehlenswert, als erste Wahl die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels (oder Kulturmediums) in Erwägung zu ziehen. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind z. B. Wasser oder Dimethylsulfoxid. Organische Lösungsmittel sollten 1 % v/v und wässrige

Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) sollten 10 % v/v im Endmedium möglichst nicht überschreiten. Werden weniger gründlich erprobte Lösungsmittel verwendet (z. B. Ethanol oder Aceton), so ist dies durch Daten zu untermauern, die ihre Verträglichkeit mit der Prüfchemikalie und mit dem Versuchssystem sowie ihre mangelnde Genotoxizität in der verwendeten Konzentration belegen. Liegen keine Daten vor, die dies belegen, sollten unbedingt unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1) einbezogen werden, um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder klastogenen Wirkungen ausgelöst werden.

Messung von Zellproliferation und Zytotoxizität und Wahl der Behandlungskonzentrationen

16. Bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (siehe Nummer 22), Ausfällungen im Kulturmedium (siehe Nummer 23) oder ausgeprägten Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (siehe Nummer 5). Sofern die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich dieser auch durch Zugabe eines Puffers ins Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.
17. Es sind Messungen der Zellproliferation vorzunehmen, um sicherzustellen, dass während des Tests eine ausreichende Zahl behandelter Zellen eine Mitose durchlaufen hat und dass die Behandlungen auf geeigneten Zytotoxizitätsniveaus durchgeführt werden (siehe Nummern 18 und 22). Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechselaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zelltod und -wachstum bestimmt werden. Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines Vorversuchs nützlich sein kann, um eine bessere Bestimmung der im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen vornehmen zu können, ist ein Vorversuch nicht zwingend erforderlich. Wird er durchgeführt, ersetzt er nicht die Messung der Zytotoxizität im Hauptversuch.
18. Die relative Populationsverdopplung (RPD) oder die relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) sind geeignete Verfahren zur Bewertung der Zytotoxizität in zytogenetischen Versuchen (13) (15) (35) (36) (55) (Formeln siehe Anlage 2). Bei Langzeitbehandlungen und Probenahmezeitpunkten nach Beginn der Behandlung, die über 1,5 normale Zellzykluslängen (d. h. mehr als 3 Zellzykluslängen insgesamt) andauern, könnte es bei der RPD zu einer Unterschätzung der Toxizität kommen (37). Unter diesen Umständen ist die RICC möglicherweise das bessere Verfahren; anderenfalls erhält man bei Bewertung der Zytotoxizität nach 1,5 normalen Zellzykluslängen beim RPD-Verfahren einen hilfreichen Schätzwert.
19. Bei Lymphozyten in Primärkulturen ist der Mitoseindex (MI), auch wenn er ein geeigneter Wert zur Messung zytotoxischer/zytostatischer Wirkungen ist, abhängig vom Zeitpunkt

der Messung nach der Behandlung, vom verwendeten Mitogen sowie möglichen Störungen des Zellzyklus. Der MI ist jedoch zulässig, da andere Verfahren zur Messung der Zytotoxizität möglicherweise zu komplex und wenig praktikabel und nicht auf die Zielpopulation der Lymphozyten anwendbar sind, die infolge der PHA-Stimulation wachsen.

20. Zwar sind das RICC- bzw. das RPD-Verfahren für Zelllinien und der MI für Primärkulturen von Lymphozyten die empfohlenen Zytotoxizitätsparameter, weitere Indikatoren (z. B. Zellintegrität, Apoptose, Nekrose, Zellzyklus) könnten jedoch nützliche Zusatzinformationen liefern.
21. Es sollten mindestens drei Versuchskonzentrationen (ausgenommen Lösungsmittel und Positivkontrollen), die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität, Anzahl der Zellen usw.), ausgewertet werden. Unabhängig von der Art der Zellen (Zelllinien oder Primärkulturen von Lymphozyten) können für jede überprüfte Konzentration Replikat- oder Einfachkulturen verwendet werden. Wenngleich die Verwendung von Zweifachkulturen ratsam ist, sind Einfachkulturen auch zulässig, vorausgesetzt, es wird für Einfach- oder Zweifachkulturen jeweils die gleiche Gesamt-Zellpopulation ausgewertet. Die Verwendung von Einzelkulturen ist insbesondere dann relevant, wenn mehr als drei Konzentrationen bewertet werden (siehe Nummer 31). Die Ergebnisse aus den unabhängigen Replikatkulturen bei einer gegebenen Konzentration können zu Datenanalysezwecken gepoolt werden (38). Bei Prüfchemikalien mit geringer oder ohne Zytotoxizität sind in der Regel Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die Versuchskonzentrationen einen Bereich ausgehend von dem Wert, bei dem Zytotoxizität auftritt (siehe Beschreibung unter Nummer 22), bis zu Konzentrationen mit mäßiger und geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven, und um Daten bei mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder die Dosis-Wirkungs-Beziehung im Einzelnen auszuwerten, wird es erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als drei Konzentrationen zu verwenden (Einfach- oder Replikatkulturen), insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (siehe Nummer 47).
22. Beruht die höchste Konzentration auf Zytotoxizität, so sollte versucht werden, unter Verwendung der empfohlenen Zytotoxizitätsparameter (d. h. Verringerung der RICC und RPD bei Zelllinien und Verringerung des MI bei Primärkulturen von Lymphozyten auf 45 ± 5 % der gleichzeitigen Negativkontrolle) mit der höchsten Konzentration eine Zytotoxizität von 55 ± 5 % zu erreichen. Vorsicht ist geboten, positive Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass sie ausschließlich am oberen Ende dieses zytotoxischen Bereichs von 55 ± 5 % anzutreffen sind (13).
23. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte

Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines inversen Mikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, bei der es zu einer Trübung oder sichtbaren Ausfällung kommt, da künstliche Wirkungen eine Folge dieser Ausfällung sein könnten. Bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, ist unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung die Durchführung des Versuchs nicht beeinträchtigt (z. B. Färbung oder Auswertung). Es ist möglicherweise sinnvoll, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.

24. Wird keine Ausfällung bzw. keine grenzwertige Zytotoxizität beobachtet, sollte die höchste Versuchskonzentration 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml entsprechen, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist (39) (40) (41). Sofern die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht vorgegeben ist, es sich z. B. um einen Stoff mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, um komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien (UVCB) (42), einen Umweltextrakt usw. handelt, muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. bei 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Komponenten zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (43).

Kontrollen

25. Bei jedem Zellerntezeitpunkt sind gleichzeitige Negativkontrollen (siehe Nummer 15) zu berücksichtigen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden.
26. Gleichzeitige Positivkontrollen müssen angelegt werden, um die Eignung des Labors zum Nachweis von Klastogenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls sowie ggf. die Wirksamkeit des exogenen Metabolisierungssystems nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Es können andere geeignete Positivkontrollchemikalien verwendet werden, sofern gerechtfertigt. Da *In-vitro*-Tests auf Gentoxizität in Säugetierzellen ausreichend standardisiert sind, kann sich die Hinzuziehung von Positivkontrollen auf ein Klastogen beschränken, das eine Stoffwechselaktivierung erfordert. Unter der Voraussetzung, dass diese einzeln durchgeführte Positivkontrolle zeitgleich zu dem nicht aktivierten Versuch mit derselben Behandlungsdauer erfolgt, wird durch ihre Wirkung sowohl die Aktivität des Metabolisierungssystems als auch die Reaktionsfähigkeit des Versuchssystems nachgewiesen. Im Falle einer Langzeitbehandlung (ohne S9) sollte jedoch eine gesonderte Positivkontrolle erfolgen, da die Behandlungsdauer beim Versuch mit Stoffwechselaktivierung eine andere ist. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare

und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt (d. h. die Wirkungen sind eindeutig, lassen aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen), und die Wirkung sollte nicht durch einen Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in der Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet.

Tabelle 1. Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzchemikalien

Kategorie	Chemikalie	CAS-Nr.
1. Klastogene, die ohne Stoffwechselaktivierung wirken		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogene, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern		
	Benzo[a]pyren	50-32-8
	Cyclophosphamid	50-18-0

VERFAHREN

Behandlung mit der Prüfchemikalie

27. Proliferierende Zellen werden mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfchemikalie behandelt.

Zeitpunkt der Zellernte

28. Um eine genaue Bewertung zu ermöglichen, die erforderlich wäre, um auf ein negatives Ergebnis schließen zu können, sollte jede der drei nachgenannten Versuchsbedingungen getestet werden - eine Kurzzeitbehandlung mit und ohne Stoffwechselaktivierung und eine Langzeitbehandlung ohne Stoffwechselaktivierung (siehe Nummern 43, 44 und 45):

- Die Zellen sollten 3 bis 6 Stunden lang ohne Stoffwechselaktivierung mit der Prüfchemikalie behandelt werden, wobei eine Probenahme nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (18).

- Die Zellen sollten 3 bis 6 Stunden lang mit Stoffwechselaktivierung mit der Prüfchemikalie behandelt werden, wobei eine Probenahme nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (18).
- Die Zellen sollten kontinuierlich ohne Stoffwechselaktivierung behandelt werden, wobei eine Probenahme nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht. Bestimmte Chemikalien (z. B. Nucleosidanaloge) sind möglicherweise leichter nachweisbar, wenn der Zeitraum für die Behandlung/Probenahme mehr als die 1,5-fache Dauer des normalen Zellzyklus beträgt (24).

In Fällen, in denen eine der oben genannten Versuchsbedingungen zu einem positiven Befund führt, kann möglicherweise auf Untersuchungen nach den anderen Behandlungsverfahren verzichtet werden.

Chromosomenpräparation

29. Die Zellkulturen werden vor der Gewinnung in der Regel ein bis drei Stunden lang mit Colcemid oder Colchicin behandelt. Für die Chromosomenpräparation wird jede Zellkultur gesondert geerntet und aufgearbeitet. Zur Chromosomenpräparation gehören die Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung, die Fixierung und das Anfärben. In Monolayern können am Ende der 3- bis 6-stündigen Behandlung mitotische Zellen vorhanden sein (diese sind daran zu erkennen, dass sie rund sind und sich von der Oberfläche lösen). Da diese mitotischen Zellen sich leicht lösen, können sie bei Entfernung des Mediums mit der Prüfchemikalie verloren gehen. Kann nachgewiesen werden, dass verglichen mit den Kontrollen die Zahl der mitotischen Zellen erheblich zugenommen hat, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen mitotischen Arrest hinweist, sollten die Zellen durch Zentrifugieren gesammelt und anschließend den Kulturen wieder zugeführt werden, um zu vermeiden, dass Zellen verlorengehen, die sich in der Mitose befinden und zum Zeitpunkt der Gewinnung dem Risiko einer Chromosomenaberration ausgesetzt sind.

Analyse

30. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sollten vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite kodiert werden. Da es bei der Fixierung bei einem Teil der Metaphasezellen häufig zum Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen dem Modalwert ± 2 entspricht.
31. Es sollten mindestens 300 gut gespreitete Metaphasen je Konzentration und Kontrolle analysiert werden, um schlussfolgern zu können, dass eine Prüfchemikalie eindeutig

negativ ist (siehe Nummer 45). Die 300 Zellen sind gleichmäßig auf die Replikate zu verteilen, sofern solche verwendet werden. Bei der Verwendung von Einzelkulturen je Konzentration (siehe Nummer 21) sollten mindestens 300 gut gespreitete Metaphasen in dieser Einzelkultur analysiert werden. Die Analyse von 300 Zellen hat den Vorteil, dass die statistische Aussagekraft des Versuchs erhöht wird; zudem sind dann kaum Nullwerte zu erwarten (erwartungsgemäß nur 5 %) (44). Die Anzahl der zu analysierenden Metaphasen kann verringert werden, wenn eine hohe Zahl von Zellen mit Chromosomenaberrationen beobachtet wird und die Prüfchemikalie als eindeutig positiv gilt.

32. Zellen mit einer oder mehreren strukturellen Chromosomenaberration(en) mit und ohne Gaps sollten analysiert werden. Brüche und Gaps sind gemäß (45) (46) in Anlage 1 definiert. Chromatidentyp- und Chromosomentypaberration sollten getrennt erfasst und Subtypen zugeordnet werden (Brüche, Austausch). Die im Labor angewandten Verfahren sollten gewährleisten, dass die Analyse von Chromosomenaberrationen von qualifizierten Technikern ausgeführt und ggfs. einer *Peer-Review* unterzogen wird.
33. Obwohl es bei dem Test um den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen geht, ist das Auftreten von Polyploidie und Endoreduplikation unbedingt festzuhalten (siehe Nummer 2).

Kompetenz des Labors

34. Um ausreichende Erfahrung mit der Durchführung des Versuchs nachzuweisen, bevor er für routinemäßige Testungen angewendet wird, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzchemikalien durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen und verschiedener Negativkontrollen bedienen (unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel/Vehikel). Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten der Literatur entsprechen. Dies gilt nicht für erfahrene Laboratorien, d. h. für Laboratorien, die über eine historische Datenbank im Sinne von Nummer 37 verfügen.
35. Eine Auswahl von Positivkontrollchemikalien (siehe Tabelle 1 unter Nummer 26) sollte anhand von Kurz- und Langzeitbehandlungen ohne Stoffwechselaktivierung und darüber hinaus anhand einer Kurzzeitbehandlung mit Stoffwechselaktivierung untersucht werden, um die Eignung des Labors zum Nachweis klastogener Chemikalien und zur Bestimmung der Wirksamkeit des Metabolisierungssystems zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollten mehrere Konzentrationen der ausgewählten Chemikalien ausgewählt werden, um reproduzierbare und konzentrationsbezogene Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

36. Das Labor sollte Folgendes nachweisen:

- Bereich und Verteilung historischer Positivkontrollen
 - Bereich und Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel)
37. Beim erstmaligen Erwerb von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Kontrolldaten entsprechen, soweit solche vorhanden sind. Kommen weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzu, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb von 95 % der Kontrollgrenzen der gewählten Verteilung liegen (44) (47). Die Datenbank des Labors für historische Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten (48)), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor „unter Kontrolle“ ist (44). Weitere Empfehlungen zu Aufbau und historischer Datensammlungen (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus historischen Datensammlungen und die Akzeptanzkriterien für einen bestimmten Versuch) sind den Literaturhinweisen zu entnehmen (47).
38. Etwaige Änderungen am Versuchsprotokoll sollten auf Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen historischen Kontrolldatenbanken geprüft werden. Bei größeren Unstimmigkeiten sollte eine neue historische Kontrolldatenbank erstellt werden.
39. Daten über Negativkontrollen sollten das Auftreten von Zellen mit Chromosomenaberrationen aus einer Einzelkultur oder aus einer Summe von Replikatkulturen umfassen (vgl. Beschreibung unter Punkt 21). Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der gewählten Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen (44) (47). Sofern gleichzeitige Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Versuchssystem „unter Kontrolle“ ist (siehe Nummer 37) und nachweislich kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Präsentation der Ergebnisse

40. Bewertet werden sollte der Anteil der Zellen mit struktureller Chromosomenaberration bzw. strukturellen Chromosomenaberrationen. Chromatidentyp- und Chromosomentypaberrationen, die Subtypen zugeordnet sind (Brüche, Austausch),

sollten dabei unter Angabe ihrer Anzahl und Häufigkeit für Versuchs- und Kontrollkulturen getrennt erfasst werden. Gaps werden getrennt erfasst und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt. Der Anteil der Zellen mit Polyploidie und/oder Endoreduplikation wird angegeben, sofern beobachtet.

41. Erfasst werden sollten auch Maßnahmen, die in den Hauptprüfungen auf Aberrationen gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität aller behandelten und Negativ- sowie Positivkontrollkulturen durchgeführt werden.
42. Die Daten für die einzelnen Kulturen sollten erfasst dokumentiert werden. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

Gültigkeitskriterien

43. Die Akzeptanz eines Versuchs beruht auf folgenden Kriterien:
 - Die Aufnahme der gleichzeitigen Negativkontrolle in die Datenbank des Labors für historische Negativkontrollen gilt als zulässig, wenn sie der Beschreibung unter Nummer 39 entspricht.
 - Gleichzeitige Positivkontrollen (siehe Nummer 26) sollten Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank für historische Positivkontrollen erzeugt werden, und, verglichen mit den gleichzeitigen Negativkontrollen, eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.
 - Die Kriterien für die Zellproliferation in der Lösungsmittelkontrolle sollten erfüllt sein (Nummern 17 und 18).
 - Es wurden alle drei Versuchsbedingungen getestet, es sei denn, eine führte zu positiven Ergebnissen (siehe Nummer 28).
 - Eine angemessene Zahl an Zellen und Konzentrationen ist analysierbar (Nummern 31 und 21).
 - Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 22, 23 und 24.

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

44. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (siehe Nummer 28):

- a) mindestens eine der Versuchskonzentrationen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme aufweist,
- b) die Zunahme bei der Bewertung anhand eines geeigneten Trendtests dosisabhängig ist,
- c) eines der Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %, siehe Nummer 39).

Sind all diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie Chromosomenaberrationen in Säugerzellkulturen in diesem Versuchssystem auslösen kann. Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweise (49) (50) (51).

45. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn in allen getesteten Versuchsbedingungen (siehe Punkt 28):

- a) keine der Versuchskonzentrationen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme aufweist,
- b) bei der Bewertung anhand eines geeigneten Trendtests keine dosisabhängige Zunahme erfolgt ist,
- c) alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %, siehe Nummer 39).

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Chromosomenaberrationen in Säugerzellkulturen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

46. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

47. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Auswertung (ggf.) weiterer Zellen oder die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen (z. B. Abstände der Konzentrationen, andere Metabolisierungsbedingungen (d. h. Konzentration (S9) oder Herkunft (S9)), könnten hilfreich sein.

48. In seltenen Fällen lässt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Schlussfolgerung zu positiven oder negativen Ergebnissen zu; in diesem Fall wird die Reaktion der Prüfchemikalie als unschlussig eingestuft.

49. Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden Zellen deutet möglicherweise darauf hin, dass die Prüfchemikalie mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag (52). Eine zahlenmäßige Zunahme der

Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, dass die Prüfchemikalie die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (53) (54) (siehe Nummer 2). Die Inzidenz von polyploiden Zellen und Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen sollte daher getrennt erfasst werden.

Prüfbericht

50. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, Osmolalität und ggf. Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- Aussehen, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, falls zutreffend und praktisch durchführbar usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

- Begründung der Wahl des Lösungsmittels.
- Der Anteil des Lösungsmittels im Endmedium sollte ebenfalls angegeben werden.

Zellen:

- Typ und Herkunft der Zellen;

- Karyotypmerkmale und Eignung des verwendeten Zelltyps;
- bei Zelllinien: Nichtvorhandensein von Mycoplasma;
- bei Zelllinien: Angaben über die Dauer des Zellzyklus, Verdopplungszeit oder Proliferationsindex;
- Geschlecht der Blutspender, Alter und sachdienliche Informationen zum Spender, Vollblut oder separierte Lymphozyten, verwendetes Mitogen;
- bei Zelllinien: ggf. Passagenanzahl;
- bei Zelllinien: ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- bei Zelllinien: Modalwert der Chromosomen.

Prüfbedingungen:

- Bezeichnung der Spindelgifte, deren Konzentration und Dauer der Zellexposition;
- Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums).
- Begründung der Wahl der Konzentrationen und der Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;
- Medienzusammensetzung, ggf. CO₂-Konzentration, Feuchtigkeit;
- Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der beigegebenen Prüfchemikalie;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- Zeitpunkt der Gewinnung nach der Behandlung;
- ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und S9 im Endmedium, Qualitätskontrollen von S9);

- Chemikalien der Positiv- und Negativkontrollen, Endkonzentrationen für die jeweiligen Behandlungsbedingungen;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers und verwendete Färbetechnik;
- Akzeptanzkriterien für Versuche;
- Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Metaphasen;
- Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;
- evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;
- Methoden zur Bestimmung von pH-Wert, Osmolalität und Ausfällung.

Ergebnisse:

- Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der je Kultur geernteten Zellen, sofern Zelllinien verwendet werden
- Bestimmung der Zytotoxizität, z. B. RPD, RICC, MI, ggf. andere Beobachtungen;
- Informationen zu Zellzyklusdauer, Verdopplungsdauer oder Proliferationsindex im Fall von Zelllinien;
- Ausfällungszeichen und Bestimmungszeit;
- Definition für Aberrationen, einschließlich Gaps;
- Anzahl der ausgewerteten Zellen, Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen mit getrennter Angabe des Chromosomenaberrationstyps für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur, mit und ohne Gaps;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie (gesonderte Angabe von polyploiden Zellen und Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen);
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);

- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und 95 %-Grenzen für die Verteilung sowie Anzahl der Datensätze.
- ggf. statistische Analysen, p-Werte.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2016). *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015*. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Evans, H.J. (1976), *Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Band 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York und London, 1-29
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), *The in vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture in Progress in Mutation Research*, Bd. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), *Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 10/Ergänz. 10, 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), *Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Band 49/4, 318-327.
- (6) Kapitel B.49 dieses Anhangs: In-Vitro-Mikronukleustest an Säugetierzellen.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, *Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing*.
- (8) Scott, D. et al. (1991), *Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Bd. 257/2, 147-204.
- (9) Morita, T. et al. (1992), *Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 268/2, 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), *Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 8/6, 789-886.

- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), *Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 634/1-2, 177-183.
- (12) Nessler, F. *et al.* (2008), *Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 49/6, 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), *Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 35/3, 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), *Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd.584/1-2, 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), *Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 43/1, 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), *Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd.31/4, 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), *Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex*, *Human Genetics*, Bd. 62, 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), *The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting*, *Mutation Research*, Bd. 338, 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), *Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*, ATLA, Bd. 33/3, 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), *Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies*, *Mutagenesis*, Bd. 12/3, 163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), *Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome*

- Mutagenicity Test, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Bd. 31/6, 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Bd. 113/3-4, 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), *Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes*, *Mutation Research*, Bd. 37/1, 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), *Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Bd. 66/3, 277-290.
- (25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), *Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver*, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Bd. 4/1, 55-65.
- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), *Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays*, *Mutagenesis*, Bd. 7/3, 175-177.
- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), *A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems*, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (Herausgeber.), Elsevier, North-Holland, 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). *Report from Working Group on in vitro Tests for Chromosomal Aberrations*, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Bd. 312/3, 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), *Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 28/1, 51-59.
- (30) UNEP (2001), *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*, United Nations Environment Programme (UNEP). Abrufbar unter: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), *Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes*, *Mutation Research*, Bd. 190/3, 225-8.

- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), *CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids*, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), *Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 5/6, 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), *An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay*, *Mutation Research*, Bd. 652/2, 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), *Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 655/1-2, 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), *Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus)*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 723/2, 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), *Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test*, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Bd. 724/1-2, 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 141-154.
- (39) OECD (2014), *Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the in vitro mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)* ENV/JM/TG(2014)17. Auf Anfrage erhältlich.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), *Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 741/1-2, 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), *Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay*, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Bd. 54/1, 36-43.

- (42) EPA, *Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances*, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Abrufbar unter: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), *Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines*, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, Nr. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (Herausgeber), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), *Metaphase chromosome aberration assays in vitro*, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (Herausgeber), Cambridge University Press, Cambridge, 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), *Compilation and use of genetic toxicity historical control Data*, *Mutation Research*, Bd. 723/2, 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, Zweite Ausgabe, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Dritte Ausgabe, John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), *Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Bd. 10/Ergänz. 10, 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays*, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Herausgeber), Cambridge University Press, Cambridge, 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), *A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens*, *Mutation Research*, Bd. 287/1, 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), *Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest*, *Mutation Research*, Bd. 119/3, 403-413.

- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Bd. 43/3, 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Bd. 312, 139-149.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Aneuploidie: Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Apoptose: programmierter Zelltod, der durch eine Reihe von Schritten charakterisiert ist, an deren Ende ein Schrumpfen von Zellen zu membrangebundenen Partikeln steht, die schließlich durch Phagozytose oder Shedding abgebaut werden.

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

Chromatidbruch: Diskontinuität in einem einzelnen Chromatid mit eindeutiger Dislokation eines der Bruchstücke.

Chromatid-Gap: nicht gefärbter Bereich (achromatische Läsion) eines einzelnen Chromatids mit minimaler Dislokation eines der Bruchstücke.

Chromatidentypaberration: strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

Chromosomentypaberration: strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

Endoreduplikation: Prozess, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16, ... Chromatiden.

Genotoxisch: allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich Brüchen, Deletionen, Addukten, Nukleotidmodifikationen und -verknüpfungen, Rearrangements, Genmutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Klastogen: Chemikalie, die strukturelle Chromosomenaberrationen in Zellpopulationen oder eukaryontischen Organismen auslöst.

Konzentrationen: beziehen sich auf Endkonzentrationen der Prüfchemikalie im Kulturmedium.

Lösungsmittelkontrolle: allgemeiner Begriff zur Bezeichnung der Kontrollkulturen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt werden, das verwendet wird, um die Prüfchemikalie zu lösen.

Mitose: Teilung des Zellkerns, die in der Regel in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert ist.

Mitoseindex (MI): Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Metaphase befinden; zugleich Hinweis auf den Grad der Zellproliferation in dieser Population.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Numerische Aberration: Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

p53-Status: Das p53-Protein ist an der Regulierung des Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt. Zellen, denen ein funktionales p53-Protein fehlt und die nicht in der Lage sind, den Zellzyklus aufzuhalten oder beschädigte Zellen über Apoptose oder andere Mechanismen (z. B. Einleitung einer DNA-Reparatur) im Zusammenhang mit Aufgaben des p53-Proteins als Reaktion auf DNA-Schäden zu beseitigen, sollten theoretisch eher zu Genmutationen oder Chromosomenaberrationen neigen.

Polyploidie: zahlenmäßige Chromosomenaberrationen in Zellen oder Organismen, von denen ein oder mehrere ganze Chromosomensätze betroffen sind, im Gegensatz zur Aneuploidie, bei der nur ein oder mehrere einzelne Chromosomen betroffen sind.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Relative Erhöhung der Zellzahl (RICC): zahlenmäßige Zunahme von Zellen in Kulturen, die mit der Chemikalie behandelt sind, verglichen mit der Zunahme in nicht behandelten Kulturen, ausgedrückt als Prozentanteil.

Relative Populationsverdopplung (RPD): Zunahme der Anzahl an Populationsverdopplungen in Kulturen, die mit der Chemikalie behandelt sind, verglichen mit der Zunahme in nicht behandelten Kulturen, ausgedrückt als Prozentanteil.

S9-Leberfraktion: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren bei 9000g, d. h. Rohleberextrakt.

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und für die metabolische Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

Strukturelle Aberration: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intrachromosomalen oder reziproken Translokationen.

Unbehandelte Kontrollen: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit der Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch gleichzeitig in gleicher Weise aufgearbeitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

Zellproliferation: Zunahme der Anzahl von Zellen als Ergebnis der mitotischen Zellteilung.

Zytotoxizität: Für die Zwecke der unter diese Prüfmethode fallenden Versuche, bei denen Zelllinien zum Einsatz kommen, bezeichnet Zytotoxizität eine Verringerung der relativen Populationsverdopplung (RPD) bzw. eine relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) der behandelten Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Nummer 17 und Anlage 2). Für die Zwecke der unter dieser Prüfmethode fallenden Versuche, bei denen Primärkulturen von Lymphozyten zum Einsatz kommen, bezeichnet Zytotoxizität eine Verringerung des Mitoseindex (MI) der behandelten Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Nummer 18 und Anlage 2).

Anlage 2**FORMELN ZUR BEWERTUNG DER ZYTOTOXIZITÄT****Mitoseindex (MI):**

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Zahl der mitotischen Zellen}}{\text{Gesamtzahl ausgewerteter Zellen}} \times 100$$

Die **relative Erhöhung der Zellzahl (RICC)** oder die **relative Populationsverdopplung (RPD)** wird empfohlen, da bei beiden der Anteil der Zellpopulation berücksichtigt wird, der eine Teilung durchlaufen hat.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{zahlenmäßige Zunahme von Zellen in behandelten Kulturen (Ende-Beginn)})}{(\text{zahlenmäßige Zunahme von Zellen in Kontrollkulturen (Ende-Beginn)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Anzahl von Populationsverdopplungen in behandelten Kulturen})}{(\text{Anzahl von Populationsverdopplungen in Kontrollkulturen})} \times 100$$

Dabei gilt:

$$\text{Populationsverdopplung} = [\log ((\text{Zellzahl nach Behandlung} \div \text{Anfängliche Zellzahl}))] \div \log 2$$

Beispielsweise deutet eine RICC oder eine RPD von 53 % auf eine Zytotoxizität/Zytostase von 47 % hin, und eine anhand des MI gemessene Zytotoxizität/Zytostase von 55 % bedeutet, dass der tatsächliche MI zu 45 % außer Kontrolle ist.

In jedem Fall sollte die Größe der Zellpopulation vor der Behandlung ermittelt werden; Gleiches gilt für behandelte Kulturen und Negativkontrollkulturen.

Wenngleich der RCC-Wert (d. h. die in behandelten Kulturen/Zellzahl in Kontrollkulturen) in der Vergangenheit als Bestimmungsgröße für die Zytotoxizität herangezogen wurde, wird er nicht mehr empfohlen, da er zu einer Unterschätzung der Toxizität führen kann.

Bei den Negativkontrollkulturen sollte die Populationsverdopplung der Anforderung gerecht werden, dass Zellprobenahmen nach der Behandlung zu einem Zeitpunkt erfolgen müssen, der etwa der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht, und der Mitoseindex sollte so hoch liegen, dass man eine ausreichend hohe Zellzahl erhält, die die Mitose erreicht, und zuverlässig mit einer 50 %igen Verringerung kalkulieren kann.“

(4) In Teil B erhält Kapitel B.11 folgende Fassung:

„B.11 Test auf Chromosomenaberrationen in Knochenmarkzellen von Säugetieren

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 475 (2016). Sie ist Teil einer Serie von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Es wurde ein OECD-Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen dieser Prüfrichtlinien enthält (1).
2. Der *In-vivo*-Test auf Chromosomenaberrationen in Knochenmarkzellen von Säugetieren ist vor allem für die Bewertung der Genotoxizität relevant, da trotz artenspezifischer Unterschiede bestimmte Faktoren den *In-vivo*-Stoffwechsel, die Pharmakokinetik und die DNA-Reparaturprozesse beeinflussen und zu den Reaktionen beitragen. Ein *In-vivo*-Versuch ist ferner hilfreich für weitere Untersuchungen zu gentoxischen Wirkungen, die in einem *In-Vitro*-System nachgewiesen wurden.
3. Der *In-vivo*-Test auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen dient dem Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen, die von Prüfchemikalien in Knochenmarkzellen von Säugetieren, in der Regel Nagetieren, ausgelöst werden (2) (3) (4) (5). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und strukturellen Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der auf gentoxischen Chemikalien beruhenden Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Chromosomenschäden und damit zusammenhängende Prozesse sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen, und es gibt wesentliche Anhaltspunkte dafür, dass diese Schäden und Prozesse, wenn sie Veränderungen an Onkogenen und Tumorsuppressorgenen auslösen, an der Entstehung von Krebs beim Menschen und in Versuchssystemen beteiligt sind. Polyploidie (einschließlich Endoreduplikation) könnte bei *In-vivo*-Versuchen zum Nachweis von Chromosomenaberrationen entstehen. Eine Polyploidie an sich ist jedoch kein Hinweis auf ein aneugenisches Potenzial und weist möglicherweise nur auf Störungen des Zellzyklus oder Zytotoxizität hin. Dieser Test dient nicht der Messung der Aneuploidie, zu deren Nachweis ein *In-vivo*-Erythrozyten-Mikrokerntest bei Säugern (vgl. Kapitel B.12 dieses Anhangs) oder der *In-vitro*-Mikronukleustest an Säugetierzellen (vgl. Kapitel B.49 dieses Anhangs) empfohlen würden.
4. Für Definitionen der verwendeten Begriffe siehe Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt, aber auch andere Arten können in einigen Fällen geeignet sein, sofern dies wissenschaftlich gerechtfertigt wird. Zielgewebe bei dieser Prüfung ist das Knochenmark, da es sich um ein gefäßreiches Gewebe mit einer Population rasch proliferierender Zellen handelt, die sich leicht isolieren und aufarbeiten lassen. Die Verwendung anderer Versuchstiere als Ratten und Mäuse sollte im Bericht wissenschaftlich begründet werden. Sofern andere Versuchstiere als Nagetiere verwendet werden, wird empfohlen, Chromosomenaberrationen in Knochenmarkszellen im Rahmen anderer geeigneter Toxizitätstests zu messen.
6. Soweit es Anhaltspunkte dafür gibt, dass die Prüfchemikalie(n) oder (ein) reaktive® Metabolit(en) das Zielgewebe nicht erreicht bzw. erreichen, ist dieser Test nicht geeignet.
7. Bevor die Prüfmethode auf ein Gemisch angewendet wird, um Daten für Regulierungszwecke zu generieren, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum sie für diese Zwecke geeignete Ergebnisse liefert. Diese Überlegungen erübrigen sich, wenn die Durchführung von Tests für das betreffende Gemisch gesetzlich vorgeschrieben ist.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Die Prüfchemikalie wird den Tieren über einen geeigneten Expositionsweg verabreicht; letztere werden nach der Behandlung zu einem angemessenen Zeitpunkt human getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid) behandelt. Anschließend werden aus den Knochenmarkszellen Chromosomen präpariert und angefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

Eignungsprüfungen

9. Um ausreichende Erfahrung mit der Durchführung des Versuchs nachzuweisen, bevor er für routinemäßige Testungen angewendet wird, sollte das Labor seine Fähigkeit zur Reproduktion erwarteter Ergebnisse aus veröffentlichten Daten (z. B. (6)) über Chromosomenaberrationshäufigkeiten mit mindestens zwei Positivkontrollchemikalien (einschließlich durch geringe Dosen positiver Kontrollen ausgelöste schwache Reaktionen), wie in Tabelle 1 aufgelistet, und mit kompatiblen Vehikel-/Lösungsmittelkontrollen demonstriert haben (siehe Nummer 22). In diesen Versuchen sollten Dosierungen verwendet werden, mit denen reproduzierbare und dosisabhängige Zunahmen erzielt werden und die die Empfindlichkeit und dynamische Bandbreite des Versuchssystems im untersuchten Gewebe (Knochenmark) demonstrieren, wobei nach der die im Labor normalerweise angewandten Auswertungsmethode vorgegangen werden

sollte. Diese Anforderung gilt nicht für erfahrene Laboratorien, d. h. für Laboratorien, die über eine historische Datenbank im Sinne der Nummern 10-14 verfügen.

Historische Kontrolldaten

10. Im Rahmen der Eignungsprüfungen sollte das Labor Folgendes nachweisen:
 - Bereich und Verteilung historischer Positivkontrollen und
 - Bereich und Verteilung historischer Negativkontrollen.
11. Beim erstmaligen Erwerb von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen mit veröffentlichten Kontrolldaten übereinstimmen, soweit solche vorhanden sind. Kommen weitere Versuchsdaten zur Verteilung der historischen Kontrollen hinzu, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb der 95 %-Kontrollgrenze dieser Verteilung liegen. Die Datenbank des Labors für historische Negativkontrollen sollte statistisch robuste Werte enthalten, die gewährleisten, dass das Labor in der Lage ist, die Verteilung seiner Negativkontrolldaten zu bewerten. Nach der Literatur reicht möglicherweise ein Minimum von 10 Versuchen aus, doch wird empfohlen, unter vergleichbaren Versuchsbedingungen mindestens 20 Versuche durchzuführen. Laboratorien sollten Qualitätskontrollverfahren wie Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten (7)) anwenden, um zu ermitteln, wie variabel ihre Daten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor „unter Kontrolle“ ist. Für weitere Empfehlungen zu Aufbau und Verwendung historischer Datensammlungen (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus historischen Datensammlungen und die Akzeptanzkriterien für einen bestimmten Versuch) siehe Literaturhinweise (8).
12. Soweit das Labor während der Eignungsprüfungen (siehe Nummer 9) nicht genügend Versuche abschließt, um eine statistisch robuste Verteilung der Negativkontrollen zu demonstrieren (siehe Punkt 11), kann die Verteilung auch während der ersten routinemäßigen Tests erstellt werden. Diese Vorgehensweise sollte sich an den Literaturempfehlungen orientieren (8), und die bei diesen Versuchen erzielten Negativkontrollergebnisse sollten mit veröffentlichten Negativkontrolldaten übereinstimmen.
13. Etwaige Änderungen am Versuchsprotokoll sollten hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die resultierenden Daten geprüft werden, die mit den bereits vorhandenen Labordaten über historische Kontrollen übereinstimmen müssen. Nur bei größeren Unstimmigkeiten sollte eine neue Datenbank für historische Kontrollen erstellt werden, soweit eine fachkundige Beurteilung ergibt, dass eine Abweichung von der vorherigen Verteilung besteht (siehe Nummer 11). Während der Neuerstellung muss für die Durchführung eines aktuellen Versuchs ggfs. keine vollständige Datenbank mit Negativkontrollen vorhanden sein, vorausgesetzt, dass Labor kann nachweisen, dass seine Werte aus gleichzeitigen

Negativkontrollen entweder mit seiner vorangegangenen Datenbank oder mit den entsprechenden veröffentlichten Daten übereinstimmen.

14. Daten über Negativkontrollen sollten das Vorkommen struktureller Chromosomenaberrationen (ohne Gaps) bei jedem Tier umfassen. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der 95 %-Kontrollgrenzen der gewählten Verteilung in der Datenbank des Labors für historische Negativkontrollen liegen. Sofern Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen außerhalb der 95 %-Kontrollgrenzen liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Versuchssystem „unter Kontrolle“ ist (siehe Nummer 11) und kein Hinweis auf technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

Auswahl der Tierart

15. Es sollten junge, gesunde und geschlechtsreife Tiere der üblichen Labortierstämme zum Einsatz kommen. Gewöhnlich werden Ratten verwendet, doch kommen auch Mäuse in Frage. Es können auch andere geeignete Säugetierarten verwendet werden, sofern dies im Bericht wissenschaftlich begründet wird.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

16. Bei Nagern sollte die Temperatur im Versuchstierraum 22 °C (\pm 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchte sollte vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen, mindestens aber 40 % betragen und außer bei Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, mit Hell-/Dunkelphasen im 12-Stunden-Rhythmus. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Wahl des Futters kann dadurch beeinflusst werden, dass es sich für die Beimischung einer Prüfchemikalie eignen muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Nagetiere können in kleinen Gruppen von Tieren gleichen Geschlechts und der gleichen Behandlungsgruppen untergebracht werden (maximal fünf pro Käfig), sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist, vorzugsweise in Käfigen mit festem Boden und entsprechender Ausgestaltung des Lebensumfelds. Die Tiere dürfen nur dann einzeln untergebracht werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist.

Vorbereitung der Tiere

17. In der Regel werden junge, gesunde und geschlechtsreife Tiere verwendet (bei Nagetieren vorzugsweise Tiere, die zu Behandlungsbeginn 6 bis 10 Wochen alt sind, wobei etwas ältere Tiere auch zulässig sind), die den Kontroll- und Behandlungsgruppen nach dem Zufallsprinzip zuzuordnen sind. Die Tiere werden nach einer humanen, minimalinvasiven Methode (z. B. durch Anbringen von Ringen, Kennmarken, Mikrochips oder biometrisch, nicht jedoch durch Kupieren der Ohren oder Zehen) einzeln gekennzeichnet. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so anzuordnen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen minimal sind. Kreuzkontaminationen zwischen Positivkontrolle und Prüfchemikalie sind zu vermeiden. Zu Beginn der Studie sollten die Körpergewichtsunterschiede zwischen den behandelten Tiere möglichst gering sein und um nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Durchschnittsgewicht des jeweiligen Geschlechts abweichen.

Vorbereitung der Dosierung

18. Feste Prüfchemikalien sollten vor ihrer Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert oder dem Futter oder Trinkwasser beigemischt werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gase, Dämpfe oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, deren die Stabilität bei Lagerung ist erwiesen und die geeigneten Lagerbedingungen sind vorgegeben.

Lösungsmittel/Vehikel

19. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosisstufen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht in Verdacht stehen, mit den Prüfchemikalien eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine gängigen Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten über ihre Kompatibilität beizubringen. Es empfiehlt sich, wann immer möglich zunächst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Beispiele für gängige, kompatible Lösungsmittel/Vehikel sind Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Methylcelluloselösung, Carboxymethylcellulose-Natriumsalzlösung, Olivenöl und Maisöl. Liegen keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vor, aus denen hervorgeht, dass keine strukturellen Aberrationen oder anderen schädlichen Wirkungen von einem gewählten, nicht gängigen Lösungsmittel/Vehikel ausgehen, sollte ein Vorversuch durchgeführt werden, der die Eignung des Lösungsmittels/Vehikels belegt.

Kontrollen

Positivkontrollen

20. Jeder Versuch sollte eine Gruppe von Tieren umfassen, die mit einer Positivkontrollchemikalie behandelt wurden. Darauf kann möglicherweise verzichtet werden, wenn das Prüflabor seine Eignung zur Durchführung des Tests demonstriert und eine Serie historischer Positivkontrollen nachgewiesen hat. Umfasst der Versuch keine gleichzeitige Positivkontrolle, sollten Auswertungskontrollen (fixierte und nicht angefärbte Objektträger) einbezogen werden. Dazu eignen sich Referenzproben, die im Rahmen eines separaten Positivkontrollversuchs, der in dem Labor, das den Versuch durchführt, in regelmäßigen Zeitabständen (z. B. alle 6 bis 18 Monate) durchgeführt wird (z. B. bei Eignungsprüfungen und danach ggf. auf regelmäßiger Basis), entnommen und gelagert wurden.
21. Positivkontrollchemikalien sollten zuverlässig bewirken, dass die Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen gemessen an der spontan entstehenden Zellmenge nachweislich zunimmt. Positivkontroll Dosen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Proben erkennen lassen. Es ist vertretbar, dass die Positivkontrolle im Rahmen eines anderen Behandlungsplans auf anderem Wege als die Prüfchemikalie verabreicht wird und nur eine einzige Probenahme erfolgt. Ggf. könnte eine zusätzliche Positivkontrolle verwendet werden, die derselben chemischen Klasse angehört wie die Prüfchemikalie. Für Beispiele für Positivkontrollchemikalien siehe Tabelle 1.

Tabelle 1. Beispiele für Positivkontrollchemikalien

Chemikalie	CAS-Nr.
Ethylmethansulfonat	62-50-0
Methylmethansulfonat	66-27-3
Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyclophosphamid(monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Triethylenmelamin	51-18-3

Negativkontrollen

22. Tiere der Negativkontrolle sollten bei jeder Probenahme berücksichtigt und genau wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, außer dass ihnen keine Prüfchemikalie verabreicht wird. Soweit zur Verabreichung der Prüfchemikalie ein Lösungsmittel/Vehikel verwendet wird, sollte die auch Kontrollgruppe dieses Lösungsmittel/Vehikel erhalten. Demonstrieren jedoch historische Negativkontrolldaten bei jeder Probenahme für das betreffende Prüflabor übereinstimmende Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen, so ist für die Negativkontrollen möglicherweise

nur eine einzige Probenahme erforderlich. Wird bei den Negativkontrollen nur eine einzige Probe entnommen, so sollte dies zum ersten Probenahmezeitpunkt erfolgen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Tiere

23. Die Mikrokernreaktion verläuft bei männlichen und weiblichen Tieren in der Regel ähnlich (9), und es ist davon auszugehen, dass dies auch für strukturelle Chromosomenaberrationen gilt, sodass die meisten Studien unabhängig vom Geschlecht durchgeführt werden können. Daten, die nennenswerte Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren demonstrieren (z. B. Unterschiede bei der systemischen Toxizität, beim Stoffwechsel, bei der Bioverfügbarkeit, bei der Knochenmarktoxizität usw., einschließlich unter anderem einer Dosisfindungsstudie), würden die Verwendung von Tieren beider Geschlechter nahe legen. In diesem Fall kann es angebracht sein, eine Studie an Tieren beider Geschlechter durchzuführen, z. B. im Rahmen einer Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung. Bei Verwendung beider Geschlechter könnte die Anwendung des faktoriellen Modells zweckdienlich sein. Für Einzelheiten zur Analyse der Daten nach diesem Modell siehe Anlage 2.
24. Zu Beginn der Studie sollten die Gruppengrößen so festgelegt werden, dass jede Gruppe mindestens 5 analysierbare Tiere eines Geschlechts oder beider Geschlechter, sofern beide Geschlechter einbezogen werden, umfasst. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. wie dies bei bestimmten Pharmazeutika der Fall ist, ist der Versuch am Tier ebenfalls geschlechtsspezifisch durchzuführen. Richtwert für eine typische Versuchstiermenge: Für eine Knochenmarkstudie mit zwei Probenahmezeitpunkten, drei Dosisgruppen und einer gleichzeitigen Negativkontrollgruppe zuzüglich einer Positivkontrollgruppe (wobei jede Gruppe aus fünf Tieren jedes Geschlechts besteht) wären maximal 45 Versuchstiere erforderlich.

Dosisstufen

25. Wird vorab eine Dosisfindungsstudie durchgeführt, da keine geeigneten Daten zur Dosisauswahl verfügbar sind, sollte diese im selben Labor unter Verwendung derselben Spezies und desselben Stamms, Geschlechts und Behandlungsverfahrens wie beim Hauptversuch stattfinden (10). Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die definiert ist als die Höchstdosis, die, bezogen auf den Versuchszeitraum, keine Anzeichen von Toxizität hervorruft, die die Studie begrenzen würden (z. B. Rückgang des Körpergewichts oder Zytotoxizität des hämatopoetischen Systems), ausgenommen Tod oder Anzeichen von Schmerzen und Leiden, die eine humane Tötung erforderlich machen würden (11).

26. Die Höchstdosis kann ferner als die Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen toxischer Wirkungen auf das Knochenmark hervorruft.
27. Chemikalien, die zu einer Sättigung der toxikokinetischen Eigenschaften führen oder Entgiftungsprozesse einleiten, die nach einer Langzeitbehandlung möglicherweise zu einem Rückgang der Exposition führen, können von den Dosierungskriterien ausgenommen werden und sollten auf Einzelfallbasis evaluiert werden.
28. Um Dosis-Wirkungs-Informationen zu erhalten, sollte eine vollständige Studie eine Negativkontrollgruppe und mindestens drei Dosisstufen (Dosis x 2, jedoch maximal x 4) vorsehen. Ruft die Prüfchemikalie in einer Dosisfindungsstudie oder nach bereits vorhandenen Daten keine Toxizität hervor, so sollte die Höchstdosis für eine Einzelgabe 2000 mg/kg Körpergewicht betragen. Ruft die Prüfchemikalie jedoch Toxizität hervor, sollte die MTD die höchste verabreichte Dosis sein, und die Dosisstufen sollten vorzugsweise einen Bereich zwischen Höchstdosis und der Dosis abdecken, die wenig oder keine Toxizität erzeugt. Wenn für alle untersuchten Dosisstufen Toxizität im Zielgewebe (Knochenmark) beobachtet wird, sind weitere Untersuchungen bei nichttoxischen Dosisstufen ratsam. Studien zur genaueren Charakterisierung der quantitativen Dosis-Wirkungs-Informationen erfordern möglicherweise weitere Dosisgruppen. Bei bestimmten Arten von Prüfchemikalien (z. B. Humanpharmazeutika), für die spezielle Anforderungen gelten, können diese Grenzen variieren.

Limit-Test

29. Weisen Dosisfindungsstudien oder bereits vorhandene Daten für verwandten Tierstämme darauf hin, dass eine Behandlung zumindest mit der Limit-Dosis (siehe Beschreibung unten) keine feststellbaren toxischen Wirkungen (und auch keinen Rückgang der Proliferation des Knochenmarks oder andere Anzeichen für toxische Wirkungen im Zielgewebe) verursacht, und ist auf Basis von *In-vitro*-Studien zur Untersuchung der Genotoxizität oder von Daten über strukturell verwandte Chemikalien keine Genotoxizität zu erwarten, so ist möglicherweise keine umfassende Studie mit drei Dosisstufen erforderlich, sofern nachgewiesen wurde, dass die Prüfchemikalie(n) das Zielgewebe (Knochenmark) erreicht bzw. erreichen. In solchen Fällen könnte eine der Limit-Dosis entsprechende Einzeldosis ausreichen. Bei einem Behandlungszeitraum von >14 Tagen beträgt die Limit-Dosis 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag. Bei einem Behandlungszeitraum von 14 oder weniger Tagen beträgt die Limit-Dosis 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag.

Verabreichung

30. Bei der Versuchsplanung ist der antizipierte Verabreichungsweg beim Menschen zu berücksichtigen. Routen wie die Aufnahme über die Nahrung oder das Trinkwasser, die topische, subkutane, intravenöse, orale (Magensonde), intratracheale Verabreichung, die Inhalation oder die Implantation sind daher als wissenschaftlich gerechtfertigt zulässig. In

jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass das (die) Zielgewebe angemessen exponiert werden. Eine intraperitoneale Injektion wird in der Regel nicht empfohlen, da diese nicht als Verabreichungsweg beim Menschen vorgesehen ist, und sollte nur mit entsprechender wissenschaftlicher Begründung angewandt werden. Sofern die Prüfchemikalie der Nahrung oder dem Trinkwasser beigemischt wird, insbesondere im Fall von Einzeldosierungen, ist darauf zu achten, dass ein ausreichender Zeitabstand zwischen der Nahrungsmittel-/Trinkwasseraufnahme und der Probenahme eingehalten wird, damit ein Nachweis der Wirkungen möglich ist (siehe Nummern 33-34). Die Höchstmenge an Flüssigkeit, die jeweils über eine Magensonde verabreicht oder injiziert werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte im Normalfall 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml/100 g in Betracht gezogen werden. Werden größere Volumina verwendet, ist dies zu begründen. Mit Ausnahme von reizenden oder ätzenden Prüfchemikalien, die normalerweise bei höheren Konzentrationen gravierende Wirkungen zeigen, sollte die Variabilität der Prüfvolumina minimiert werden, indem die Konzentration angepasst wird, dass im Verhältnis zum Körpergewicht bei allen Dosisstufen ein konstantes Volumen verabreicht wird.

Behandlungsplan

31. Prüfchemikalien werden in der Regel auf einmal verabreicht. Die Gabe kann aber auch in Form von zwei oder mehreren Teilmengen erfolgen (am gleichen Tag im Abstand von nicht mehr als 2 bis 3 Stunden), wenn es sich um eine große Menge handelt. In diesen Fällen, oder wenn die Prüfchemikalie durch Inhalation verabreicht wird, sollte der Zeitpunkt der Probenahme auf Basis der letzten Dosisgabe oder des Zeitpunkts, an dem die Exposition beendet wurde, angesetzt werden.
32. Es liegen nur wenige Informationen darüber vor, ob sich ein Protokoll für wiederholte Verabreichung für diesen Versuch eignet. In Fällen, in denen es zweckmäßig erscheint, diesen Versuch in einen Toxizitätstest mit wiederholter Verabreichung einzubinden, ist ein Verlust von mitotischen Zellen mit beschädigten Chromosomen zu vermeiden, wozu es bei toxischen Dosierungen kommen kann. Eine solche Einbindung ist zulässig, wenn die höchste Dosis der Limit-Dosis entspricht oder größer ist (siehe Nummer 29) und eine Dosisgruppe für die Dauer des Behandlungszeitraums die Limit-Dosis erhält. Soll eine Einbindung in andere Studien erfolgen, sollte vorrangig der Mikrokerntest (Prüfmethode B.12) als *In-vivo*-Test für Chromosomenaberrationen gewählt werden.
33. Knochenmarkproben sollten an zwei verschiedenen Zeitpunkten im Anschluss an Einzelbehandlungen genommen werden. Bei Nagern sollte das erste Probenahmeintervall der Dauer von 1,5 normalen Zellzyklen (die in der Regel 12 bis 18 Stunden nach der Behandlung abgeschlossen sind) entsprechen. Da die für die Aufnahme und Metabolisierung der Prüfchemikalie(n) sowie für die Wirkung auf die Zellzykluskinetik

benötigte Zeit den optimalen Zeitpunkt für die Feststellung von Chromosomenaberrationen beeinflussen kann, wird empfohlen, 24 Stunden nach der ersten Probenahme eine weitere Probenahme vorzunehmen. Bei der ersten Probenahme sollten alle Dosisgruppen behandelt, und es sollten Proben für die Analyse aufgearbeitet werden. Bei (einer) weiteren Probenahme(n) muss nur die Höchstdosis verabreicht werden. Werden Verabreichungsschemata gewählt, die über einen Tag hinausgehen, und ist dies wissenschaftlich begründet, sollte die Probenahme im Anschluss an die letzte Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht.

34. Nach der Behandlung und vor der Aufarbeitung der Proben erhalten die Versuchstiere eine intraperitoneale Injektion mit einer geeigneten Dosis eines Spindelgifts (z. B. Colcemid oder Colchicin), und nach einem angemessenen Zeitraum im Anschluss daran erfolgt die Aufarbeitung. Bei Mäusen beträgt dieser Zeitraum etwa 3 bis 5 Stunden vor der Aufarbeitung und bei Ratten 2 bis 5 Stunden. Aus dem Knochenmark werden Zellen gewonnen, aufgequollen, fixiert und angefärbt und anschließend auf Chromosomenaberrationen untersucht (12).

Beobachtungen

35. Mindestens einmal täglich sollten allgemeine klinische Beobachtungen der Versuchstiere vorgenommen und vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, protokolliert werden. Mindestens zweimal täglich während der Verabreichungszeit sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu untersuchen. Alle Tiere sollten zu Studienbeginn, mindestens einmal pro Woche bei Studien mit wiederholter Verabreichung sowie bei humaner Tötung gewogen werden. In Studien von mindestens einwöchiger Dauer sollten mindestens wöchentlich Messungen der Futteraufnahme vorgenommen werden. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere mit Anzeichen von übermäßiger, jedoch nicht tödlich wirkender Toxizität sollten vor Ende des Prüfzeitraums human getötet werden (11).

Exposition des Zielgewebes

36. Zu (einem) geeigneten Zeitpunkt(en) sollte eine Blutprobe gezogen werden, um den Plasmaspiegel der Prüfchemikalien untersuchen zu können. Dadurch soll nachgewiesen werden, dass eine Exposition des Knochenmarks stattgefunden hat, wo dies gerechtfertigt erscheint und keine anderen Expositionsdaten vorhanden sind (siehe Nummer 44).

Knochenmark- und Chromosomenpräparate

37. Die Knochenmarkzellen werden in der Regel unmittelbar nach der humanen Tötung aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen der Tiere gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden anschließend nach anerkannten Verfahren auf Objektträger aufgetropft und angefärbt (siehe (3) (12)).

Analyse

38. Alle Objektträger, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen, sollten vor der Analyse unabhängig kodiert und randomisiert werden, damit die Auswertung ohne Kenntnis der Behandlungsbedingungen erfolgt.
39. Bei allen behandelten Tieren (einschließlich der Positivkontrollen), unbehandelten oder mit einem Lösungsmittel/Vehikel behandelten Tieren der Negativkontrollgruppe ist der Mitoseindex als Gradmesser der Zytotoxizität in mindestens 1 000 Zellen pro Tier zu bestimmen.
40. Pro Tier sollten mindestens 200 Metaphasen auf strukturelle Chromosomenaberrationen, mit und ohne Gaps, analysiert werden (6). Wenn jedoch aus den historischen Negativkontrolldaten hervorgeht, dass die durchschnittliche Hintergrundhäufigkeit für strukturelle Chromosomenaberrationen im Prüflabor $< 1\%$ beträgt, sollte eine Auswertung weiterer Zellen in Erwägung gezogen werden. Chromatidentyp- und Chromosomentypaberrationen sollten gesondert erfasst und Subtypen zugeordnet werden (Brüche, Austausch). Die Laborpraxis sollte gewährleisten, dass die Analyse von Chromosomenaberrationen von gut ausgebildeten Labortechnikern vorgenommen und ggf. einer *Peer-Review* unterzogen wird. Da es bei der Präparation der Objektträger häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen und zum Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen eine Zentromerzahl enthalten, die der Zahl $2n \pm 2$ entspricht, wobei n die haploide Chromosomenzahl für diese Spezies ist.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Behandlung der Ergebnisse

41. Die Daten für die einzelnen Tiere sollten tabellarisch erfasst werden. Für jedes Tier sollten der Mitoseindex, die Anzahl der bewerteten Metaphasezellen, die Zahl der Aberrationen pro Metaphasezelle und der Anteil der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen angegeben werden. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sollten die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen unter Angabe ihrer Anzahl und Häufigkeit aufgeführt werden. Gaps sowie polyploide Zellen und Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen werden getrennt erfasst. Die Häufigkeit von Gaps ist anzugeben, wird in der Regel bei der Analyse der Gesamthäufigkeit der Aberrationen jedoch nicht berücksichtigt. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der

Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter für die statistische Analyse zusammengefasst werden. Daten zur Toxizität und klinische Anzeichen bei Tieren sind ebenfalls anzugeben.

Gültigkeitskriterien

42. Die folgenden Kriterien entscheiden über die Gültigkeit des Versuchs:

- a) Die Aufnahme der gleichzeitigen Negativkontrolldaten in die Labordatenbank für historische Negativkontrollen ist zulässig (siehe Nummern 11-14);
- b) die gleichzeitigen Positivkontrollen oder Auswertungskontrollen sollten Reaktionen auslösen, die mit denen aus den historischen Positivkontrolldaten kompatibel sind und verglichen mit der Negativkontrolle eine statistisch signifikante Zunahme bewirken (siehe Nummern 20-21);
- c) es wurde die richtige Anzahl an Dosen und Zellen analysiert;
- d) die Kriterien für die Wahl der Höchstdosis stimmen mit den unter den Nummern 25-28 beschriebenen Kriterien überein.

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

43. Unter der Voraussetzung, dass alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn

- a) mindestens eine der Behandlungsgruppen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme der Häufigkeit von Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen (ohne Gaps) aufweist,
- b) diese Zunahme bei Bewertung nach einem geeigneten Trendtest bei mindestens einer Probenahme dosisabhängig ist und
- c) eines dieser Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %).

Wird zu einem bestimmten Probenahmezeitpunkt nur die Höchstdosis untersucht, so gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme vorliegt und die Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %). Empfehlungen zu geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (13). Bei der Durchführung einer Dosis-Wirkungs-Analyse sollten mindestens drei behandelte Dosisgruppen analysiert werden. Bei statistischen Versuchen sollte das Tier Versuchseinheit sein. Positive Ergebnisse beim Chromosomenaberrationstest deuten darauf hin, dass eine Prüfchemikalie Chromosomenaberrationen im Knochenmark der getesteten Spezies auslöst.

44. Unter der Voraussetzung, dass alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn unter allen getesteten Versuchsbedingungen

- a) keine der Behandlungsgruppen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme der Häufigkeit von Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen (ohne Gaps) aufweist,
- b) bei Bewertung nach einem geeigneten Trendtest zu keinem Probenahmezeitpunkt eine dosisabhängige Zunahme festgestellt wird,
- c) alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %) und
- d) eine Exposition des Knochenmarks gegenüber der /den Prüfchemikalie(n) erfolgt ist.

Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweis (13). Als Nachweis für eine Exposition des Knochenmarks gegenüber einer Prüfchemikalie kann auch ein Rückgang des Mitoseindex oder eine Untersuchung der Plasma- oder Blutspiegel der Prüfchemikalie(n) dienen. Bei intravenöser Verabreichung ist kein Expositionsnachweis erforderlich. Alternativ können ADME-Daten herangezogen werden, die in einer unabhängigen Studie unter Verwendung der gleichen Verabreichungswege und der gleichen Spezies gewonnen wurden, um nachzuweisen, dass eine Knochenmarkexposition stattgefunden hat. Negative Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Prüfchemikalie unter den Versuchsbedingungen keine strukturellen Chromosomenaberrationen im Knochenmark der getesteten Spezies hervorruft.

45. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist keine Verifizierung erforderlich.
46. In Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern (z. B. eine geringe oder grenzwertige Zunahme), sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. In einigen Fällen kann die Auswertung weiterer Zellen oder die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen, hilfreich sein.
47. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz auch nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage darüber, ob die Prüfchemikalie positive oder negative Ergebnisse zur Folge hat; in diesen Fällen wird die Studie als unschlussig abgeschlossen.
48. Die Häufigkeit des Auftretens polyploider und endoreduplizierter Metaphasen gemessen an der Gesamtzahl der Metaphasen sollte getrennt erfasst werden. Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden/endoreduplizierten Zellen deutet möglicherweise darauf hin, dass die Prüfchemikalie mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag (siehe Abschnitt 3).

Prüfbericht

49. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Zusammenfassung

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer und ggf. äußerstes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentige Substanz:

- Aussehen, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw.

Mehrkomponentige Substanz, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Zubereitung der Prüfchemikalie:

- Begründung der Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel/in einem Vehikel, falls bekannt;
- Zubereitung von Formulierungen für Nahrung, Trinkwasser oder Inhalationspräparaten;
- analytische Bestimmung der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen), wenn erfolgt.

Versuchstiere:

- Art/Stamm, Begründung für die Verwendung;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.
- Methode zur individuellen Kennzeichnung der Tiere;
- bei Kurzzeitstudien: individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn und am Ende der Studie; bei Studien über einer Woche: individuelles Körpergewicht während der Studie und Futteraufnahme. Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg und die Verabreichungsdauer;
- Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie(n) in den allgemeinen Kreislauf oder ins Knochenmark gelangt;
- Angaben zur tatsächlichen Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), errechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Trinkwasser (ppm) und ggf. deren Aufnahmemenge;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- Angaben zur Methode der humanen Tötung;
- Analgesiemethode (sofern angewandt);
- nähere Angaben zu Behandlungs- und Probenahmezeitplänen mit Begründung;
- Methode für die Präparation der Objektträger;
- Methode zur Untersuchung der Toxizität;
- Bezeichnung des Spindelgifts und Angabe seiner Konzentration und Dosierung sowie des Zeitpunkts seiner Verabreichung vor der Probenahme;

- Verfahren zur Isolierung und Konservierung der Proben;
- Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;
- Anzahl der pro Tier analysierten Metaphasezellen und Anzahl der für die Bestimmung des Mitoseindex analysierten Zellen;
- Kriterien für die Gültigkeit der Studie;
- Kriterien für die Einstufung der Studie als positiv, negativ oder unschlussig.

Ergebnisse:

- Zustand des Tiers vor und während des Versuchszeitraums, einschließlich Anzeichen von Toxizität;
- Mitoseindex, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Typ und Zahl der aberranten Zellen, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie, einschließlich Häufigkeiten von polyploiden und/oder endoreduplizierten Zellen;
- ggfs. Dosis-Wirkungsverhältnis;
- statistische Analysen und angewandte Methode;
- Daten zum Nachweis, dass eine Exposition des Knochenmarks stattgefunden hat;
- gleichzeitige Negativkontroll- und Positivkontrolldaten mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- historische Negativkontroll- und Positivkontrolldaten mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und 95 %-Kontrollgrenzen für die Verteilung sowie Behandlungszeitraum und Zahl der Beobachtungen;
- für eine positive oder negative Reaktion erfüllte Kriterien.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

Referenzdokumente.

LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Band 189/2, 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Bericht. Überarbeiteter Teil I, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Band 312/3, 305-312.
- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Band 417/1, 19-30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Band 723/2, 87-90.
- (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Band 312/3, 293-304.
- (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Band 7/5, 313-319.
- (11) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used

in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Band 1044, 147-163.
- (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Bericht, Teil III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 184-232.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Aneuploidie: jede Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl um ein oder mehrere Chromosomen, jedoch nicht um ganze Chromosomensätze (*vgl.* Polyploidie).

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

Chromatidentypaberration: strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

Chromosomentypaberration: strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

Endoreduplikation: Prozess, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4,8,16, ... Chromatiden.

Gap: achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide mit minimaler Verlagerung der Chromatiden.

Mitoseindex: Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in der Mitose befinden: Gradmesser für den Vermehrungsgrad dieser Population.

Numerische Aberration: Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Tiere charakteristisch ist (Aneuploidie).

Polyploidie: numerische Chromosomenaberration, von der ein ganzer Chromosomensatz betroffen ist, im Gegensatz zu einer numerischen Abweichung in einem Teil des Chromosomensatzes (*vgl.* Aneuploidie).

Prüfchemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Strukturelle Chromosomenaberration: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung; äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intra-chromosomalen oder reziproken Translokationen.

Zentromere: Region(en) eines Chromosoms, an die die Spindelfasern während der Zellteilung anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

Anlage 2

FAKTORIELLES MODELL ZUR ERMITTLUNG GESCHLECHTSSPEZIFISCHER DIFFERENZEN BEIM *IN-VIVO*-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN

Faktorielles Modell und zugehörige Analysen

Bei diesem Modell werden mindestens 5 männliche und 5 weibliche Tiere je Konzentration getestet, d. h. insgesamt mindestens 40 Versuchstiere (20 männliche und 20 weibliche zuzüglich Positivkontrollen).

Das Modell, das zu den einfacheren Faktormodellen zählt, entspricht einer Zweifach-Varianzanalyse, bei der Geschlecht und Konzentration im Wesentlichen die Wirkung bestimmen. Die Daten können im Rahmen zahlreicher Standard-Statistiksoftwareanwendungen wie SPSS, SAS, STATA oder Genstat oder auch mit „R“ analysiert werden.

Mit der Analyse lässt sich die Varianz im Datensatz als Varianz zwischen den Geschlechtern, Varianz zwischen den Konzentrationen und Varianz bezogen auf die Interaktion zwischen den Geschlechtern und Konzentrationen abbilden. Jede Bedingung wird an einem Schätzwert der Varianz zwischen den Replikattieren in den gleichgeschlechtlichen Tiergruppen, die die gleiche Konzentration erhalten, gemessen. Die zugrundeliegende Methodik ist in vielen Standardwerken zur Statistik (siehe Referenzdokumente) und in den in Statistiksoftware-Paketen mitgelieferten Hilfe-Funktionen näher beschrieben.

Die Analyse beginnt mit der Untersuchung der Interaktionsbedingung „Konzentration x Geschlecht“ nach der ANOVA-Tabelle¹. Liegt keine signifikante Interaktion vor, liefern die kombinierten Werte für die Geschlechter oder Konzentrationen gültige statistische Tests für die jeweiligen Konzentrationen, und zwar basierend auf der ANOVA-Bedingung der innerhalb der Gruppe gepoolten Varianzen.

Es folgt eine Partitionierung des Schätzwerts für die Varianzen zwischen den

¹ Statistiker, die mit einem Modellierungsansatz wie dem Ansatz der allgemeinen linearen Modelle (GLM) arbeiten, folgen bei der Analyse möglicherweise einem anderen, wenn auch vergleichbarem Ansatz, werden jedoch nicht notwendigerweise eine Herleitung der herkömmlichen Anova-Tabelle vornehmen, die auf algorithmische Lösungswege für statistische Berechnungen aus dem Vor-Computerzeitalter zurückgeht.

Konzentrationen in Kontraste, die einen Test für lineare und quadratische Kontraste aus den Reaktionen der verschiedenen Konzentrationen liefern. Ergibt sich hingegen eine signifikante Interaktion für Term „Konzentration x Geschlecht“, so kann dieser Term auch in Interaktionskontraste „linearer Wert x Geschlecht“ und „quadratischer Wert x Geschlecht“ partitioniert werden. Aufgrund dieser Terme lässt sich prüfen, ob die Reaktionen der jeweiligen Konzentrationen für beide Geschlechter parallel verlaufen oder ob es zwischen den Geschlechtern zu einer differenzierten Reaktion kommt.

Anhand des Schätzwerts für die innerhalb der Gruppe gepoolten Varianzen lassen sich paarweise Tests auf Abweichungen zwischen Mittelwerten durchführen. Diese Vergleiche könnten zwischen den Mittelwerten für die beiden Geschlechter und zwischen den Mittelwerten für die verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden, beispielsweise um einen Vergleich mit den Negativkontrollen vorzunehmen. In Fällen mit signifikanter Interaktion können Vergleiche zwischen den Mittelwerten verschiedener Konzentrationen innerhalb eines Geschlechts oder zwischen den Mittelwerten beider Geschlechter bei gleicher Konzentration vorgenommen werden.

Referenzdokumente

Es sind viele Werke zur Statistik erhältlich, in denen die Theorie, der Aufbau, die Methodik, die Analyse und die Interpretation faktorieller Analysemodelle erörtert werden, von einfachen Zweifaktorenanalysen bis hin zu komplexeren Formen, wie sie in der „Design of Experiment“-Methode verwendet werden. Die folgende Auflistung ist nicht erschöpfend. Einige Bücher enthalten Beispielrechnungen zu vergleichbaren Versuchsplänen, in einigen Fällen auch mit einem Code zur Durchführung der Analysen unter Verwendung verschiedener Softwarepakete.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc."

(5) In Teil B erhält Kapitel B.12 folgende Fassung:

„B.12 Erythrozyten-Mikrokerntest bei Säugern

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 474 (2016). Sie ist Teil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Es wurde ein OECD-Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen dieser Prüfrichtlinien enthält (1).
2. Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugern ist insbesondere für die Bewertung der Genotoxizität relevant, da trotz artenspezifischer Unterschiede Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und von DNA-Reparaturprozessen aktiv sind und zu den Reaktionen beitragen. Ein In-vivo-Versuch ist ferner hilfreich für weitere Untersuchungen zu genotoxischen Wirkungen, die in einem In-Vitro-System nachgewiesen wurden.
3. Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugern dient zum Nachweis einer von der Prüfchemikalie in den Chromosomen oder im mitotischen Apparat von Erythroblasten hervorgerufenen Schädigung. Der Test untersucht die Bildung von Mikrokernen in Erythrozyten, von denen Stichproben entweder aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut von Tieren, in der Regel Nagern, entnommen wurden.
4. Zweck des Mikrokerntests ist der Nachweis von Chemikalien, die zytogenetische Schäden hervorrufen, durch die es zur Bildung von Mikrokernen mit zurückgebliebenen Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen kommt.
5. Wenn sich ein Knochenmarkerythroblast zu einem unreifen Erythrozyten (manchmal auch als polychromatischer Erythrozyt oder Retikulozyt bezeichnet) entwickelt, wird der Hauptkern ausgestoßen. Dabei kann aber ein möglicherweise entstandener Mikrokern im Zytoplasma verbleiben. Die Sichtbarmachung bzw. das Aufspüren der Mikrokerne wird in diesen Zellen dadurch erleichtert, dass sie keinen Hauptkern aufweisen. Eine Zunahme der Häufigkeit von mikrokernhaltigen unreifen Erythrozyten in behandelten Tieren deutet auf die Verursachung struktureller oder numerischer Chromosomenaberrationen hin.
6. Neu gebildete mikrokernhaltige Erythrozyten werden durch Färben identifiziert und quantifiziert und im Anschluss daran visuell mithilfe eines Mikroskops oder anhand eines automatisierten Verfahrens analysiert. Das Zählen einer ausreichenden Zahl unreifer Erythrozyten im peripheren Blut oder Knochenmark geschlechtsreifer Tiere wird erheblich erleichtert durch die Verwendung eines automatisierten Auswertungssystems. Solche

Systeme stellen vertretbare Alternativen zur manuellen Auswertung dar (2). Vergleichende Studien haben ergeben, dass solche Verfahren unter Verwendung geeigneter Kalibrierstandards eine bessere Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit (innerhalb und zwischen Labors) bieten als eine mikroskopische Auswertung (3) (4). Automatisierte Systeme zur Messung der Häufigkeit von mikrokernhaltigen Erythrozyten umfassen unter anderem Durchflusszytometer (5), Bildanalyseplattformen (6) (7) und Laser-Scanning-Zytometer (8).

7. Auch wenn dies im Rahmen des Tests normalerweise nicht erfolgt, können Chromosomenfragmente von ganzen Chromosomen anhand einiger Kriterien unterschieden werden. Dazu zählt die Feststellung des Vorhandenseins oder Fehlens einer Kinetochor- bzw. Zentromer-DNA in den Mikrokernen; beides ist charakteristisch für intakte Chromosomen. Das Fehlen einer Kinetochor- bzw. Zentromer-DNA deutet darauf hin, dass der Mikrokern nur Fragmente von Chromosomen enthält, wohingegen das Vorhandensein auf einen Chromosomenverlust hinweist.

8. Die Definitionen zur verwendeten Terminologie sind Anlage 1 zu entnehmen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

9. Zielgewebe für genetische Schäden ist in diesem Test das Knochenmark junger geschlechtsreifer Nagetiere, da Erythrozyten in diesem Gewebe gebildet werden. Die Mikrokernuntersuchung in unreifen Erythrozyten in peripherem Blut ist auch bei anderen Säugetierarten vertretbar, für die eine entsprechende Empfindlichkeit zum Nachweis von Chemikalien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen in diesen Zellen auslösen, nachgewiesen (durch Induktion von Mikrokernen in unreifen Erythrozyten) und eine wissenschaftliche Begründung geliefert wurde. Hauptendpunkt ist die Häufigkeit der nicht ausgereiften mikrokernhaltigen Erythrozyten. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum behandelt, der die Lebensdauer des Erythrozyten in der verwendeten Spezies überschreitet (z. B. 4 Wochen oder länger bei Mäusen), kommt aber auch der Anteil der Mikrokern enthaltenden ausgereiften Erythrozyten im peripheren Blut von Spezies, bei denen in der Milz kein übermäßiger Abbau von Mikrokernzellen erfolgt, als Endpunkt des Tests in Betracht.

10. Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfchemikalie(n) oder ein reaktiver Metabolit bzw. reaktive Metaboliten das Zielgewebe nicht erreicht bzw. erreichen, ist dieser Test nicht geeignet.

11. Bevor die Prüfmethode auf ein Gemisch angewendet wird, um unter bestimmten gesetzgeberischen Aspekten Daten zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum, sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Diese Überlegungen erübrigen sich, sofern die Durchführung von Tests für das Gemisch gesetzlich vorgeschrieben ist.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Die Prüfchemikalie wird den Tieren über einen geeigneten Applikationsweg verabreicht. Bei Verwendung von Knochenmark werden sie zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung human getötet. Das Knochenmark wird entnommen, präpariert und gefärbt (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Findet peripheres Blut Verwendung, so wird es zu geeigneten Zeitpunkten nach der Behandlung entnommen, präpariert und gefärbt (12) (16) (17) (18). Bei akuter Verabreichung ist es wichtig, den Zeitpunkt der Gewinnung des Knochenmarks oder Blutes so zu wählen, dass die behandlungsabhängige Induktion von nicht ausgereiften mikrokernhaltigen Erythrozyten nachweisbar ist. Werden Blutproben aus peripherem Blut entnommen, sollte ausreichend Zeit vergangen sein, damit diese Vorgänge im zirkulierenden Blut nachweisbar sind. Die Präparate werden auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht, entweder durch mikroskopische Darstellung, Bildanalyse, Durchflusszytometrie oder Laser-Scanning-Zytometrie.

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

Untersuchungen zur Eignung

13. Zum Nachweis ausreichender Erfahrungen mit der Durchführung des Versuchs, bevor er für routinemäßige Testungen verwendet wird, sollte das Labor die Eignung zur Reproduktion erwartbarer Ergebnisse aus den veröffentlichten Daten (17) (19) (20) (21) (22) für Mikrokernhäufigkeiten mit mindestens zwei Positivkontrollchemikalien (einschl. durch geringe Dosen von Positivkontrollen ausgelöste schwache Reaktionen), wie in Tabelle 1 aufgelistet, und mit kompatiblen Vehikel-/Lösungsmittelkontrollen nachgewiesen haben (siehe Nummer 26). In diesen Versuchen sollten Dosierungen verwendet werden, mit denen man reproduzierbare und dosisabhängige Zunahmen erhält und die Empfindlichkeit und dynamische Bandbreite des Versuchssystems im untersuchten Gewebe (Knochenmark oder peripheres Blut) nachweisen kann; außerdem sollte die Auswertungsmethode verwendet werden, die im Labor eingesetzt werden soll. Diese Anforderung gilt nicht für erfahrene Labs, d. h. für Labs, die über historische Daten gemäß Definition unter den Nummern 14-18 verfügen.

Historische Kontrolldaten

14. Im Rahmen der Untersuchungen zur Eignung des Labors sollte das Labor Folgendes nachweisen:

- Bereich und Verteilung historischer Positivkontrollen und
- Bereich und Verteilung historischer Negativkontrollen.

15. Bei der erstmaligen Gewinnung von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen mit veröffentlichten Kontrolldaten übereinstimmen, sofern solche vorhanden sind. Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der historischen Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb der 95 %-Kontrollgrenze der gewählten Verteilung liegen. Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte statistisch solide Werte enthalten, um sicherzustellen, dass das Labor in der Lage ist, die Verteilung seiner Negativkontrolldaten zu bewerten. In der Literatur wird eine Mindestanzahl von 10 Versuchen vorgeschlagen; vorzugsweise sollte der Datensatz jedoch mindestens 20 Versuche umfassen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten (23)), um zu ermitteln, wie variabel ihre Daten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor „unter Kontrolle“ ist. Weitere Empfehlungen zum Aufbau und zur Verwendung historischer Datensammlungen (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus historischen Datensammlungen und die Gültigkeitskriterien für einen bestimmten Versuch) sind den Literaturhinweisen zu entnehmen (24).
16. Wenn das Labor während der Untersuchungen zur Eignung des Labors (siehe Nummer 13) keine ausreichende Zahl von Versuchen zum Nachweis einer statistisch soliden Verteilung der Negativkontrollen abschließt (siehe Nummer 15), kann die Verteilung auch während der ersten routinemäßigen Tests festgelegt werden. Diese Vorgehensweise sollte sich an den in der Literatur vorgegebenen Empfehlungen orientieren (24) und die bei diesen Versuchen erhaltenen Negativkontrollergebnisse sollten mit veröffentlichten Negativkontrolldaten übereinstimmen.
17. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die zu gewinnenden Daten zu prüfen, die mit den bereits vorhandenen Daten zu historischen Kontrollen übereinstimmen müssen. Nur bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank zu historischen Kontrollen erstellt werden, wenn eine fachkundige Beurteilung eine Abweichung von der vorherigen Verteilung ergibt (siehe Nummer 15). Während der Neuerstellung muss für die Durchführung eines aktuellen Versuchs gegebenenfalls keine vollständige Datenbank mit Negativkontrollen vorhanden sein, vorausgesetzt, das Labor kann nachweisen, dass seine Werte aus gleichzeitigen Negativkontrollen entweder mit seiner vorhergehenden Datenbank oder mit den entsprechenden veröffentlichten Daten übereinstimmen.
18. Daten zu Negativkontrollen sollten vorhandene nicht ausgereifte mikrokernhaltige Erythrozyten bei jedem Tier erfassen. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der 95 %-Kontrollgrenzen der Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen. Sofern Daten zu den gleichzeitigen Negativkontrollen außerhalb der 95 %-Kontrollgrenzen liegen, ist es zulässig, sie in die

historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Versuchssystem „unter Kontrolle“ ist (siehe Nummer 15) und kein Hinweis auf ein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorbereitungen

Auswahl der Tierspezies

19. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Es können Mäuse, Ratten oder andere geeignete Säugetierarten verwendet werden. Wird peripheres Blut verwendet, ist nachzuweisen, dass der in der Milz erfolgende Abbau Mikrokerne enthaltender Zellen aus dem Blutkreislauf nicht den Nachweis induzierter Mikrokerne in der gewählten Spezies beeinträchtigt. Bei Mäusen und Ratten konnte dies eindeutig nachgewiesen werden (2). Die wissenschaftliche Begründung für die Verwendung anderer Versuchstiere als Ratten und Mäuse sollte in den Bericht aufgenommen werden. Sofern andere Versuchstiere als Nagetiere verwendet werden, wird empfohlen, die Messung induzierter Mikrokerne in einen anderen geeigneten Toxizitätstest einzubinden.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

20. Bei Nagern sollte die Temperatur im Versuchstierraum 22 °C (\pm 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchte sollte vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen, mindestens aber 40 % betragen und außer bei Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden sollte. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters kann dadurch beeinflusst werden, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfchemikalie gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Nagetiere sollten in kleinen Gruppen (maximal fünf pro Käfig) von Tieren gleichen Geschlechts und der gleichen Behandlungsgruppen untergebracht werden, sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist, vorzugsweise in Käfigen mit festem Boden und angemessener Ausgestaltung des Lebensumfelds. Die Tiere können nur dann einzeln untergebracht werden, wenn dies wissenschaftlich begründet ist.

Vorbereitung der Versuchstiere

21. In der Regel werden junge gesunde Tiere verwendet (bei Nagetieren vorzugsweise Tiere, die bei Behandlungsbeginn 6 bis 10 Wochen alt sind, wobei etwas ältere Tiere auch

zulässig sind), die den Kontroll- und Behandlungsgruppen nach dem Zufallsprinzip zuzuordnen sind. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere unter Verwendung einer humanen, minimalinvasiven Methode (z. B. durch Anbringen von Ringen, Marken, Mikrochips oder durch biometrische Identifizierung, nicht jedoch durch Kupieren der Ohren oder Zehen). Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Eine gegenseitige Kontamination durch die Positivkontrolle und die Prüfchemikalie ist zu vermeiden. Bei Beginn der Studie sollte die Schwankung des Körpergewichts der behandelten Tiere gering sein und um nicht mehr als maximal $\pm 20\%$ vom mittleren Gewicht für jedes Geschlecht abweichen.

Vorbereitung der Dosierung

22. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert oder dem Futter oder Trinkwasser beigemischt werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gase, Dämpfe oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen und die entsprechenden Lagerbedingungen werden definiert.

Prüfbedingungen

Lösungsmittel/Vehikel

23. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und mit den Prüfchemikalien keine chemische Reaktion eingehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Beispiele für üblicherweise verwendete, kompatible Lösungsmittel/Vehikel sind Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Methylcelluloselösung, Carboxymethylcellulose-Natriumsalzlösung, Olivenöl und Maisöl. Liegen keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vor, aus denen hervorgeht, dass von einem gewählten, üblicherweise nicht verwendeten Lösungsmittel/Vehikel keine Mikrokerne oder andere schädliche Wirkungen induziert werden, sollte ein Vorversuch durchgeführt werden, um die Akzeptanz des Lösungsmittels/Vehikels nachzuweisen.

Kontrollen

Positivkontrollen

24. Jeder Versuch sollte in der Regel eine Gruppe von Tieren umfassen, die mit einer Positivkontrollchemikalie behandelt wurden. Darauf kann möglicherweise verzichtet werden, wenn das Prüflabor seine Eignung für die Durchführung des Tests nachgewiesen und einen bestimmten Bereich historischer Positivkontrollen etabliert hat. Enthält der Versuch keine gleichzeitige Positivkontrolle, sind Auswertungskontrollen (fixierte und nicht gefärbte Objektträger oder Zellsuspensionen, je nach Auswertungsmethode) in jeden Versuch zu integrieren. Diese erhält man beispielsweise im Rahmen von Untersuchungen zur Eignung des Labors und danach gegebenenfalls auf regelmäßiger Basis, indem bei der Auswertung der Studie geeignete Referenzproben hinzugezogen werden, die bei einem gesonderten, regelmäßig (z. B. alle 6 bis 18 Monate) durchgeführten Positivkontrollversuch gewonnen und aufbewahrt wurden.
25. Positivkontrollchemikalien sollten zuverlässig eine nachweisliche Zunahme der Häufigkeit von Mikrokernen gegenüber dem spontanen Niveau erzeugen. Erfolgt eine manuelle mikroskopische Auswertung, sind Positivkontrolldosen so zu wählen, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Proben erkennen lassen. Es ist vertretbar, dass die Positivkontrolle unter Verwendung eines anderen Behandlungsplans auf anderem Wege als die Prüfchemikalie verabreicht wird und nur eine einzige Probenahme erfolgt. Gegebenenfalls könnte auch eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Chemikalie. Beispiele für Positivkontrollchemikalien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. Beispiele für Positivkontrollchemikalien.

Chemikalien und CAS-Nr.
Ethylmethansulfonat [CAS-Nr. 62-50-0]
Methylmethansulfonat [CAS-Nr. 66-27-3]
Ethylnitrosoharnstoff [CAS-Nr. 759-73-9]
Mitomycin C [CAS-Nr. 50-07-7]
Cyclophosphamid(monohydrat) [CAS-Nr. 50-18-0 (CAS-Nr. 6055-19-2)]
Triethylenmelamin [CAS-Nr. 51-18-3]
Colchicin [CAS-Nr. 64-86-8] oder Vinblastin [CAS-Nr. 865-21-4] – als Aneugen

Negativkontrollen

26. Zu jedem Probenahmezeitpunkt sind Tiere der Negativkontrollgruppe einzubeziehen, die - abgesehen davon, dass ihnen die Prüfchemikalie nicht verabreicht wird - ebenso behandelt

werden wie die Behandlungsgruppen. Sofern ein Lösungsmittel/Vehikel bei der Verabreichung der Prüfchemikalie verwendet wird, sollte die Kontrollgruppe dieses Lösungsmittel/Vehikel erhalten. Wenn jedoch aus historischen Negativkontrolldaten für das Prüflabor zu jedem Stichprobenzeitpunkt übereinstimmende Werte zur Variabilität der Tiere und zur Häufigkeit der Zellen mit Mikrokernen hervorgehen, ist bei den Negativkontrollen gegebenenfalls nur eine einzige Probenahme erforderlich. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Probenahme, so ist diese zum ersten in der Studie vorgesehenen Probenahmezeitpunkt vorzunehmen.

27. Bei Verwendung von peripherem Blut ist anstelle einer gleichzeitigen Negativkontrolle möglicherweise auch eine vor der Behandlung entnommene Probe vertretbar, jedoch nur bei Kurzzeitstudien unter der Voraussetzung, dass die gewonnenen Daten mit der historischen Kontrolldatenbank für das Prüflabor übereinstimmen. Es wurde belegt, dass bei Ratten die Entnahme von Proben kleiner Volumina (z. B. unter 100 µl/Tag) vor der Behandlung nur minimale Auswirkungen auf die Hintergrundhäufigkeit von Mikrokernen hat (25).

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Tiere

28. Die Mikrokernreaktion verläuft im Normalfall bei männlichen und weiblichen Tieren ähnlich. Daher können die meisten Studien unabhängig vom Geschlecht durchgeführt werden (26). Daten, aus denen nennenswerte Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren hervorgehen (z. B. Unterschiede bei der systemischen Toxizität, beim Stoffwechsel, bei der Bioverfügbarkeit, bei der Knochenmarktoxizität usw., auch beispielsweise im Rahmen einer Dosisfindungsstudie), würden die Verwendung von Tieren aus jedem Geschlecht nahe legen. In diesem Fall kann es angebracht sein, eine Studie an Tieren beider Geschlechter durchzuführen, z. B. als Teil einer Toxizitätsstudie bei wiederholter Verabreichung. Gegebenenfalls ist die Verwendung eines faktoriellen Versuchsplans geeignet, wenn beide Geschlechter einbezogen werden. Einzelheiten zur Analyse der Daten bei Verwendung eines solchen Versuchsplans sind in Anlage 2 enthalten.
29. Zu Beginn der Studie sollten die Gruppengrößen so bestimmt werden, dass man pro Gruppe mindestens 5 analysierbare Tiere pro Geschlecht oder aus beiden Geschlechtern, sofern beide Geschlechter einbezogen werden, erhält. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten Pharmazeutika, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen. Bei einer gemäß den unter Nummer 37 festgelegten Parametern durchgeführten Knochenmarkstudie mit drei Dosisgruppen und gleichzeitigen Negativ- und Positivkontrollen (wobei jede Gruppe aus fünf Tieren eines einzigen Geschlechts besteht) kann als Richtwert für die üblicherweise

erforderliche Höchstmenge an Tieren eine Anzahl von 25 bis 35 Versuchstieren angegeben werden.

Dosierungen

30. Wenn zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt wird, da keine geeigneten Daten zur Dosierungswahl verfügbar sind, sollte diese im gleichen Labor unter Verwendung des/der gleichen Spezies, Rasse, Geschlechts und Behandlungsverfahrens wie im Hauptversuch stattfinden (27). Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die definiert ist als die höchste Dosierung, die vertragen wird, ohne dass Anzeichen von Toxizität auftreten, die die Studie, bezogen auf den Untersuchungszeitraum, begrenzen würden (z. B. durch Rückgang des Körpergewichts oder Zytotoxizität des blutbildenden Systems, ausgenommen jedoch Tod oder Anzeichen von Schmerzen und Leiden, die eine humane Tötung erforderlich machen würden (28)).
31. Die Höchstdosis kann auch als Dosis definiert werden, die Toxizität im Knochenmark hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Anteils unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten im Knochenmark oder peripheren Blut von mehr als 50 %, nicht jedoch auf weniger als 20 % des Kontrollwerts). Bei der Analyse von CD71-positiven Zellen im peripheren Blutkreislauf (d. h. anhand einer Durchflusszytometrie) reagiert diese sehr junge Fraktion unreifer Erythrozyten jedoch schneller als die größere RNA-positive Kohorte unreifer Erythrozyten auf toxische Einwirkungen. Daher kann sich gegebenenfalls eine höhere scheinbare Toxizität bei Versuchsplänen mit akuter Exposition ergeben, bei denen die Fraktion der CD71-positiven unreifen Erythrozyten untersucht wird, vergleicht man sie mit der von unreifen Erythrozyten mit entsprechendem RNA-Gehalt. Aus diesem Grund kann die Höchstdosis für Toxizität hervorrufende Prüfchemikalien bei Versuchen mit fünf oder weniger Behandlungstagen auch als die Dosis verstanden werden, die eine statistisch signifikante Verringerung des Anteils CD71-positiver unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten hervorruft, nicht jedoch auf weniger als 5 % des Kontrollwerts (29).
32. Chemikalien, die eine Sättigung der toxikokinetischen Eigenschaften aufweisen oder Entgiftungsprozesse einleiten, die nach einer Langzeitgabe möglicherweise zu einem Rückgang der Exposition führen, entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden.
33. Um Dosis-Wirkungs-Informationen zu erhalten, sollte eine vollständige Studie eine Negativkontrollgruppe und mindestens drei Dosierungen enthalten, die sich in der Regel um einen Faktor von 2 (maximal von 4) unterscheiden. Ruft die Prüfchemikalie in einer Dosisfindungsstudie oder auf der Basis bereits vorhandener Daten keine Toxizität hervor, sollte die höchste Dosierung für einen Behandlungszeitraum von 14 Tagen oder mehr 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag bzw. für Behandlungszeiträume von weniger als 14 Tagen 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag betragen. Ruft die Prüfchemikalie jedoch Toxizität

hervor, sollte die MTD die höchste verabreichte Dosierung sein und die Dosierung sollte vorzugsweise einen Bereich vom Höchstwert bis zu einer Dosierung, die wenig oder keine Toxizität erzeugt, abdecken. Wenn bei allen untersuchten Dosierungen toxische Wirkungen im Zielgewebe (Knochenmark) beobachtet werden, sind weitere Untersuchungen bei nichttoxischen Dosierungen anzuraten. Studien zur ausführlicheren Charakterisierung der quantitativen Dosis-Wirkungs-Informationen erfordern gegebenenfalls weitere Dosisgruppen. Bei bestimmten Arten von Prüfchemikalien (z. B. Humanpharmazeutika), für die spezielle Anforderungen gelten, können die Grenzen variieren.

Limit-Test

34. Wenn Dosisfindungsstudien oder bereits vorhandene Daten von verwandten Tierstämmen darauf hindeuten, dass eine Behandlung mit mindestens der Limit-Dosis (siehe Beschreibung unten) keine feststellbaren toxischen Wirkungen (und auch keinen Rückgang der Proliferation des Knochenmarks oder andere Anzeichen für toxische Wirkungen im Zielgewebe) verursacht, und wenn auf der Basis von In-vitro-Studien zur Untersuchung der Genotoxizität oder von Daten strukturell verwandter Chemikalien keine Genotoxizität zu erwarten ist, ist eine vollständige Studie mit drei Dosierungen gegebenenfalls nicht erforderlich, vorausgesetzt, es wurde nachgewiesen, dass die Prüfchemikalie(n) das Zielgewebe (Knochenmark) erreicht bzw. erreichen. In solchen Fällen ist eine Einzeldosierung mit der Limit-Dosis gegebenenfalls ausreichend. Bei einem Behandlungszeitraum von 14 Tagen oder mehr beträgt die Limit-Dosis 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag. Bei Behandlungszeiträumen von weniger als 14 Tagen beträgt die Limit-Dosis 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag.

Verabreichung

35. Bei der Versuchsplanung sind die zu erwartenden Verabreichungswege beim Menschen zu berücksichtigen. Verabreichungswege, wie etwa eine Aufnahme über die Nahrung, über das Trinkwasser, eine topische, subkutane, intravenöse, orale (über eine Magensonde), intratracheale Verabreichung, durch Inhalation oder Implantation, sind mit entsprechender Begründung zu wählen. In jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass das bzw. die Zielgewebe eine angemessene Exposition erfährt bzw. erfahren. Eine intraperitoneale Injektion wird in der Regel nicht empfohlen, da diese nicht als Verabreichungsweg beim Menschen vorgesehen ist, und sollte nur mit spezieller wissenschaftlicher Begründung angewandt werden. Sofern die Prüfchemikalie der Nahrung oder dem Trinkwasser beigemischt wird, insbesondere im Fall von Einzeldosierungen, ist darauf zu achten, einen ausreichenden Abstand zwischen der Nahrungsmittel- und Trinkwasseraufnahme und der Probenahme einzuhalten, damit ein Nachweis der Wirkungen möglich ist (siehe Nummer 37). Die Höchstmenge an Flüssigkeit, die jeweils über eine Magensonde oder eine Injektion verabreicht werden

kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte im Normalfall 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml/100 g in Betracht gezogen werden. Werden größere Volumina verwendet, ist dies zu begründen. Mit Ausnahme von reizenden oder ätzenden Prüfchemikalien, die normalerweise bei höheren Konzentrationen gravierende Wirkungen zeigen, sollte die Variabilität der Prüfvolumina durch Anpassung der Konzentration auf ein konstantes Volumen im Verhältnis zum Körpergewicht bei allen Dosen möglichst gering gehalten werden.

Behandlungsplan

36. Vorzugsweise werden 2 oder mehr Behandlungen durchgeführt mit Verabreichung der Prüfchemikalie in Abständen von 24 Stunden, insbesondere wenn dieser Test in andere Toxizitätsstudien eingebunden wird. Alternativ können Einzelbehandlungen erfolgen, wenn dies wissenschaftlich begründet ist (wenn z. B. bekannt ist, dass die Prüfchemikalie den Zellzyklus blockiert). Die Prüfchemikalien können auch in Form von zwei oder mehreren Teilmengen am gleichen Tag im Abstand von nicht mehr als 2 bis 3 Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. In diesen Fällen, oder wenn die Prüfchemikalie durch Inhalation verabreicht wird, sollte der Zeitpunkt der Probenahme ausgehend von der letzten Dosis oder dem Zeitpunkt, an dem die Exposition beendet wurde, geplant werden.
37. Die Prüfung kann an Mäusen oder Ratten auf dreierlei Weise durchgeführt werden:
 - a. Die Tiere erhalten die Prüfchemikalie einmal. Knochenmark wird mindestens zweimal (von unabhängigen Gruppen von Tieren) entnommen, wobei die erste Probenahme frühestens 24 Stunden nach der Behandlung und die letzte spätestens 48 Stunden nach der Behandlung erfolgen muss (mit angemessenen Abständen zwischen den Probenahmen), es sei denn, eine Prüfchemikalie verfügt bekanntermaßen über außergewöhnlich lange Halbwertszeiten. Wird eine Probe bereits früher als 24 Stunden nach der Behandlung entnommen, so ist dies zu begründen. Bei Verwendung peripheren Bluts werden mindestens zweimal Proben entnommen (von derselben Gruppe von Tieren), wobei die erste Probenahme frühestens 36 Stunden nach der Behandlung und die letzte spätestens 72 Stunden nach der Behandlung zu erfolgen hat und nach der ersten Probenahme angemessene Abstände einzuhalten sind. Bei der ersten Probenahme sollten alle Dosisgruppen behandelt und zur Analyse aufgearbeitet werden. Bei einer oder mehreren weiteren Probenahmen muss nur die höchste Dosierung verabreicht werden. Wird bei einer Probenahme eine positive Reaktion verzeichnet, so ist die Entnahme weiterer Proben nicht erforderlich, es sei denn, es werden quantitative Dosis-Wirkungs-Informationen benötigt. Die beschriebenen Gewinnungszeitpunkte ergeben sich aus der Kinetik des Auftretens und Verschwindens der Mikrokerne in diesen zwei Gewebekompartimenten.

- b. Bei 2 Behandlungen pro Tag (z. B. zwei Behandlungen in Abständen von 24 Stunden) sollte eine Probenahme einmalig 18 bis 24 Stunden nach der letzten Behandlung beim Knochenmark oder einmalig 36 bis 48 Stunden nach der letzten Behandlung bei peripherem Blut erfolgen (30). Die beschriebenen Gewinnungszeitpunkte ergeben sich aus der Kinetik des Auftretens und Verschwindens der Mikrokerne in diesen zwei Gewebekompartimenten.
- c. Bei 3 oder mehr Behandlungen pro Tag (z. B. drei oder mehr Behandlungen in Abständen von etwa 24 Stunden) sollte eine Probenahme beim Knochenmark spätestens 24 Stunden nach der letzten Behandlung und bei peripherem Blut spätestens 40 Stunden nach der letzten Behandlung erfolgen (31). Durch diese Behandlungsoption können der Comet-Assay (z. B. Probenahme 2 bis 6 Stunden nach der letzten Behandlung) mit dem Mikrokerntest kombiniert und der Mikrokerntest in Toxizitätstests mit Wiederholungsdosen integriert werden. Gesammelte Daten lassen darauf schließen, dass über diese breiter angelegten Zeiträume eine Induktion von Mikrokerneln zu beobachten ist, wenn 3 oder mehr Applikationen stattgefunden haben (15).
38. Sofern relevant oder wissenschaftlich begründet und zur leichteren Einbindung in andere Toxizitätstests sind auch andere Dosierungs- oder Probenahmeverfahren vertretbar.

Beobachtungen

39. Mindestens einmal täglich - vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist - sollten allgemeine klinische Beobachtungen der Versuchstiere vorgenommen und protokolliert werden. Mindestens zweimal täglich während der Verabreichungszeit sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen. Alle Tiere sollten zu Studienbeginn, mindestens einmal pro Woche während Studien mit Wiederholungsdosen und bei humaner Tötung gewogen werden. In Studien von mindestens einwöchiger Dauer sollten mindestens wöchentlich Messungen der Futteraufnahme vorgenommen werden. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere mit Anzeichen von übermäßiger, jedoch nicht tödlich wirkender Toxizität sollten vor Ende des Prüfzeitraums human getötet werden (28). Unter bestimmten Umständen kann die Körpertemperatur der Versuchstiere überwacht werden, da behandlungsabhängige Hyper- und Hypothermien eine Rolle bei falschen Ergebnissen gespielt haben mögen (32) (33) (34).

Exposition des Zielgewebes

40. Zu einem oder mehreren geeigneten Zeitpunkten sollte eine Blutprobe genommen werden, um eine Untersuchung der Plasmaspiegel der Prüfchemikalie zu ermöglichen. Damit soll

nachgewiesen werden, dass eine Exposition des Knochenmarks stattgefunden hat, wo dies gerechtfertigt erscheint und keine anderen Expositionsdaten vorhanden sind (siehe Nummer 48).

Knochenmark-/Blutpräparation

41. Die Knochenmarkzellen werden in der Regel unmittelbar nach der humanen Tötung aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen gewonnen. Dabei werden die Zellen gewöhnlich entnommen und unter Verwendung erprobter Methoden präpariert und gefärbt. Kleine Mengen peripheren Bluts können, unter Einhaltung entsprechender Tierschutznormen, entweder anhand einer Methode gewonnen werden, die ein Überleben des Versuchstiers ermöglicht, wie z. B. eine Blutentnahme aus der Schwanzvene oder einem anderen geeigneten Blutgefäß, oder durch Kardialpunktion oder Blutentnahme aus einem großen Blutgefäß bei humaner Tötung des Versuchstiers. Bei Erythrozyten sowohl aus dem Knochenmark als auch aus peripherem Blut werden die Zellen, abhängig von der Analysemethode, sofort supravital gefärbt (16) (17) (18), es werden Ausstrichpräparate hergestellt und sie werden dann für mikroskopische Zwecke gefärbt, oder die Zellen werden fixiert und für eine Durchflusszytometrie-Analyse entsprechend gefärbt. Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs [z. B. Acridin Orange (35) oder Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Trotz dieses Vorteils ist aber die Verwendung herkömmlicher Farbstoffe (z. B. Giemsa für mikroskopische Analyse) nicht ausgeschlossen. Zusätzliche Systeme [z. B. Cellulosesäulen zur Entfernung kernhaltiger Zellen (37) (38)] können ebenfalls verwendet werden, falls diese Systeme nachweislich für die Aufbereitung von Proben im Labor kompatibel sind.
42. Sofern diese Verfahren anwendbar sind, können Anti-Kinetochor-Antikörper (39), FISH mit panzentromerischen DNA-Sonden (40) oder eine In-situ-Markierung mit Panzentromer-spezifischen Primern zusammen mit einer geeigneten DNA-Gegenfärbung (41) zur Untersuchung der Art der Mikrokerne (Chromosom/Chromosomenfragment) herangezogen werden, um zu bestimmen, ob der der Mikrokerninduktion zugrunde liegende Mechanismus auf clastogene und/oder aneugene Wirkungen zurückzuführen ist. Es können auch andere Verfahren zur Unterscheidung zwischen Clastogenen und Aneugenen verwendet werden, sofern ihre Wirksamkeit nachgewiesen wurde.

Analyse (manuell und automatisiert)

43. Alle Objektträger oder Analysenproben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen, sollten vor der Analyse, gleich welcher Art, unabhängig kodiert und randomisiert werden, damit die Auswertung ohne Kenntnis der Behandlungsbedingungen erfolgt. Eine solche Codierung erübrigt sich, wenn automatisierte Auswertungssysteme verwendet werden, die nicht auf einer Sichtprüfung beruhen und keinen Bedienungseinflüssen unterliegen. Der

Anteil unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl (unreife + reife Erythrozyten) wird für jedes Tier bestimmt, indem bei Verwendung von Knochenmark mindestens 500 Erythrozyten und bei Verwendung von peripherem Blut mindestens 2000 Erythrozyten gezählt werden (42). Je Tier werden mindestens 4000 unreife Erythrozyten auf das Vorhandensein von unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten untersucht (43). Wenn aus der Datenbank der historischen Negativkontrollen hervorgeht, dass die mittlere Hintergrundhäufigkeit für unreife mikrokernhaltige Erythrozyten im Prüflabor $< 0,1\%$ beträgt, sollte eine Auswertung weiterer Zellen in Erwägung gezogen werden. Bei der Analyse der Proben sollte der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten in behandelten Tieren nicht weniger als 20% des Anteils in der (Vehikel-/Lösungsmittel)kontrolle bei einer mikroskopischen Auswertung und nicht weniger als etwa 5% des Anteils in der (Vehikel-/Lösungsmittel)kontrolle bei Auswertung der unreifen CD71+-Erythrozyten anhand von zytometrischen Verfahren betragen (siehe Nummer 31) (29). Bei einem mikroskopisch ausgewerteten Knochenmarktest würde die Höchstgrenze der Toxizität beispielsweise bei einem Anteil unreifer Erythrozyten von 10% liegen, wenn der Anteil der unreifen Erythrozyten im Knochenmark bei den Kontrollen 50% beträgt.

44. Da die Milz von Ratten mikrokernhaltige Erythrozyten sequestriert und vernichtet, ist es zur Beibehaltung einer hohen Empfindlichkeit des Tests bei der Analyse von peripherem Blut von Ratten ratsam, die Analyse mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten auf die jüngste Fraktion zu beschränken. Bei der Verwendung automatisierter Analysemethoden können diese am wenigsten ausgereiften Erythrozyten aufgrund ihres hohen RNA-Gehalts oder ihres hohen Anteils an Transferrin-Rezeptoren (CD71+) auf ihrer Oberfläche nachgewiesen werden (31). Der direkte Vergleich verschiedener Färbemethoden hat jedoch ergeben, dass mit unterschiedlichen Methoden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können, darunter auch die herkömmliche Färbung mit Acridin Orange (3) (4).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Behandlung der Ergebnisse

45. Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Die Anzahl der ausgewerteten unreifen Erythrozyten, die Anzahl mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten und der Anteil unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl sind getrennt für jedes Tier aufzulisten. Werden Mäuse kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, sind auch die Daten zur Anzahl und zum Anteil mikrokernhaltiger reifer Erythrozyten anzugeben, sofern sie erfasst wurden. Daten zur Toxizität bei Tieren und klinische Anzeichen sind ebenfalls anzugeben.

Gültigkeitskriterien

46. Die folgenden Kriterien entscheiden über die Gültigkeit des Versuchs:

- a. die Aufnahme der Daten zu den gleichzeitigen Negativkontrollen in die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen ist zulässig (siehe Nummern 15-18);
- b. die gleichzeitigen Positivkontrollen oder Auswertungskontrollen sollten Reaktionen auslösen, die mit denen kompatibel sind, die in der Datenbank zu den historischen Positivkontrollen erzeugt werden, und verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle eine statistisch signifikante Zunahme bewirken (siehe Nummern 24-25);
- c. es wurde die entsprechende Anzahl an Dosierungen und Zellen analysiert;
- d. die Kriterien für die Wahl der höchsten Dosierung stimmen mit den unter den Nummern 30-33 beschriebenen überein.

Bewertung und Interpretation der Ergebnisse

47. Unter der Voraussetzung, dass alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn

- a. mindestens eine der Behandlungsgruppen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme der Häufigkeit mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten aufweist,
- b. diese Zunahme bei der Bewertung mit einem geeigneten Trendtest mindestens zu einem Probenahmezeitpunkt dosisabhängig ist und
- c. eines oder mehrere dieser Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %).

Wird zu einem bestimmten Probenahmezeitpunkt nur die höchste Dosierung untersucht, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme vorliegt und die Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %). Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (44) (45) (46) (47). Bei der Durchführung einer Dosis-Wirkungs-Analyse sollten mindestens drei behandelte Dosisgruppen analysiert werden. Bei statistischen Versuchen sollte das Tier als Versuchseinheit zugrunde gelegt werden. Positive Ergebnisse im Mikrokerntest deuten darauf hin, dass eine Prüfchemikalie Mikrokern induziert, die das Ergebnis von Chromosomenschäden oder einer Schädigung im mitotischen Apparat von Erythroblasten der getesteten Spezies sind. In den Fällen, in denen der Test durchgeführt wurde, um Zentromere in Mikrokernen nachzuweisen, dient eine Prüfchemikalie, die zentromerhaltige

Mikrokerne erzeugt (zentromerische DNA oder Kinetochore, die auf den Verlust ganzer Chromosomen hinweisen) als Nachweis dafür, dass es sich bei der Prüfchemikalie um ein Aneugen handelt.

48. Unter der Voraussetzung, dass alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn unter allen untersuchten Versuchsbedingungen
- a. keine der Behandlungsgruppen, verglichen mit der gleichzeitigen Negativkontrolle, eine statistisch signifikante Zunahme der Häufigkeit mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten aufweist,
 - b. zu keinem Probenahmezeitpunkt eine dosisabhängige Zunahme bei der Bewertung mit einem geeigneten Trendtest vorliegt,
 - c. alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %) und
 - d. eine Exposition des Knochenmarks gegenüber der /den Prüfchemikalie(n) erfolgt ist.

Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (44) (45) (46) (47). Als Nachweis für eine Exposition des Knochenmarks gegenüber einer Prüfchemikalie kann ein Rückgang des Verhältnisses von unreifen zu reifen Erythrozyten oder der gemessenen Plasma- oder Blutspiegel der Prüfchemikalie dienen. Im Falle einer intravenösen Verabreichung ist kein Nachweis für eine Exposition zu erbringen. Alternativ dazu können ADME-Daten herangezogen werden, die in einer unabhängigen Studie unter Verwendung der gleichen Verabreichungswege und der gleichen Spezies gewonnen wurden, um nachzuweisen, dass eine Knochenmarkexposition stattgefunden hat. Negative Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Prüfchemikalie unter den Versuchsbedingungen keine Mikrokerne in den unreifen Erythrozyten der getesteten Spezies erzeugt.

49. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.
50. In den Fällen, in denen die Reaktion weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern (z. B. eine geringe oder grenzwertige Zunahme), sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen der vorliegenden abgeschlossenen Versuche bewertet werden. In einigen Fällen kann die Auswertung weiterer Zellen oder die Durchführung eines Wiederholungsversuchs unter veränderten Versuchsbedingungen hilfreich sein.

51. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz auch nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage darüber, ob die Prüfchemikalie positive oder negative Ergebnisse zur Folge hat, und die Studie wird daher als nicht eindeutig abgeschlossen.

Prüfbericht

52. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Zusammenfassung

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, gegebenenfalls Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, falls zutreffend und praktisch durchführbar usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Zubereitung der Prüfchemikalie:

- Begründung der Auswahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;
- Zubereitung von Formulierungen für Nahrung, Trinkwasser oder Inhalationspräparaten;
- analytische Bestimmung der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen), wenn erfolgt.

Versuchstiere:

- verwendete(r) Spezies/Stamm, Begründung für deren Verwendung;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.
- Methode zur eindeutigen Identifizierung der Tiere;
- bei Kurzzeitstudien: individuelles Gewicht der Tiere bei Beginn und am Ende der Studie; bei Studien über einer Woche: individuelles Körpergewicht während der Studie und Futteraufnahme. Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer gegebenenfalls durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfchemikalie;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- Begründung für den Verabreichungsweg und die Verabreichungsdauer;
- Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie(n) in den allgemeinen Kreislauf oder ins Zielgewebe gelangt bzw. gelangen;
- Angaben zur tatsächlichen Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), errechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) und gegebenenfalls der Futteraufnahme;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- Angaben zur humanen Tötungsmethode;
- Analgesiemethode (sofern angewandt);
- nähere Angaben zu Behandlungs- und Probenentnahmeplänen und Begründungen für die Wahl;
- Methode für die Präparation der Objektträger;

- Verfahren zur Isolierung und Konservierung der Proben;
- Methode zur Untersuchung der Toxizität;
- Kriterien für die Auswertung mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten;
- Anzahl der pro Tier zur Bestimmung der Häufigkeit mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten und zur Bestimmung des Verhältnisses unreifer/reifer Erythrozyten analysierten Zellen;
- Kriterien für die Gültigkeit der Studie;
- gegebenenfalls Verfahren, wie z. B. die Verwendung von Anti-Kinetochor-Antikörpern oder Zentromer-spezifischen DNA-Sonden, zur Ermittlung ganzer oder fragmentierter Chromosomen in den Mikrokernen.

Ergebnisse:

- Zustand des Tiers vor und während des Testzeitraums, einschließlich Anzeichen von Toxizität;
- Anteil unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten;
- Anzahl mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten, gesondert für jedes Tier anzugeben;
- Mittelwert und Standardabweichung mikrokernhaltiger unreifer Erythrozyten je Gruppe;
- gegebenenfalls Dosis-Wirkungsverhältnis;
- statistische Analysen und angewandte Methoden;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- historische Negativkontroll- und Positivkontrolldaten mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und 95 %-Kontrollgrenzen für die Verteilung sowie Behandlungszeitraum und Anzahl der Datenpunkte;
- Daten zum Nachweis, dass eine Exposition des Knochenmarks stattgefunden hat;
- gegebenenfalls Charakterisierungsdaten, aus denen hervorgeht, ob Mikrokerne ganze oder fragmentierte Chromosomen enthalten;
- für eine positive oder negative Reaktion erfüllte Kriterien.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

Referenzdokumente.

LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Band 627/1, 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Band 94/1, 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Band 94/1, 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Band 26/1, 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Band 370/1, 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Band 404/1-2, 149-154.
- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Band 44/2, 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Band 18/2, 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Band 31/1, 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-

Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Band 123/1, 61-118.

- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Band 239/1, 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Band 11, 555-558.
- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Band 189/2, 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Band 14/3, 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Band 245/4, 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Band 278/2-3, 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Band 10/3, 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Band 23/4, 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Band 453/1, 45-50.

- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test--study design and statistical power, *Mutagenesis*, Band 24/5, 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Band 32/1, 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Band 723/2, 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Band 723/2, 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Band 312/3, 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Band 7/5, 313-319.
- (28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Band 54/3, 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Band 10/4, 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Band 35/3, 234-252.

- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Band 390/1-2, 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Band 413/1, 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Band 97/1, 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Band 120/4, 241-247.
- (36) MacGregor, J.T. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Band 120/4, 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Band 213/1, 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Band 439/1, 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagenesis*, Band 5/4, 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Band 6/4, 297-302.
- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Band 107/2, 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Band 347/2, 97-99.
- (43) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

- (44) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 115-141.
- (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 184-232.
- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Band 102/Suppl 1, 49-52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Band 469/2, 233-241.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Erythroblast: Frühe Entwicklungsstufe von Erythrozyten, unmittelbar vor der Bildung unreifer Erythrozyten, bei der die Zelle noch einen Zellkern enthält.

Kinetochores: Proteinstruktur, die dem Zentromer eukaryotischer Zellen aufsitzt und die Chromosomen während der Mitose und Meiose mit Mikrotubuli-Polymeren aus dem mitotischen Spindelapparat verbindet, wodurch während der Zellteilung die Schwesterchromatiden auseinander gezogen werden.

Mikrokerne: kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von diesen getrennt, die während der Telophase der Mitose (Meiose) durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

Normochromatischer oder reifer Erythrozyt: vollständig ausgereifter Erythrozyt, der nicht mehr die nach der E nukleation verbleibende residuale RNA und/oder andere kurzlebige Zellmarker nach der E nukleation im Anschluss an die letzte Teilung in den Erythroblasten enthält.

Polychromatischer oder unreifer Erythrozyt: neu gebildeter Erythrozyt in einer Zwischenstufe der Entwicklung, der sich aufgrund des Vorhandenseins residualer RNA in den neu gebildeten Zellen sowohl mit den blauen als auch den roten Komponenten klassischer Blutfarbstoffe, wie z. B. Giemsa von Wright, färben lässt. Solche neu gebildeten Zellen entsprechen in etwa den Retikulozyten, die mithilfe eines Vitalfarbstoffs sichtbar gemacht werden, durch den die residuale RNA in einem Retikulum ausfällt. Zum Nachweis der neu gebildeten roten Blutkörperchen werden derzeit oft andere Verfahren verwendet, unter anderem die monochromatische Färbung von RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen oder die Kennzeichnung kurzlebiger Oberflächenmarker wie CD71 mit fluoreszierenden Antikörpern. Polychromatische Erythrozyten, Retikulozyten und CD71-positive Erythrozyten sind allesamt den unreifen Erythrozyten zuzuordnen, auch wenn sie vom Alter geringfügig verschieden verteilt sind.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Retikulozyt: neu gebildeter Erythrozyt, mit einem Vitalfarbstoff gefärbt, durch den residuale zelluläre RNA in einem charakteristischen Retikulum ausfällt. Bei Retikulozyten und

polychromatischen Erythrozyten ist das Zellalter ähnlich verteilt.

Zentromere: Region(en) eines Chromosoms, an die während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

Anlage 2

FAKTORIELLER VERSUCHSPLAN ZUR ERMITTLUNG GESCHLECHTSSPEZIFISCHER UNTERSCHIEDE BEIM IN-VIVO-MIKROKERNTEST

Faktorieller Versuchsplan und zugehörige Analysen

Anhand dieses Versuchsplans werden mindestens 5 männliche und 5 weibliche Tiere je Konzentration getestet. So ergibt sich ein Versuch, bei dem mindestens 40 Tiere verwendet werden (20 männliche und 20 weibliche zzgl. entsprechende Positivkontrollen).

Der Versuchsaufbau, der zu den einfacheren faktoriellen Versuchsplänen zählt, entspricht einer Zweiwege-Varianzanalyse, wobei das Geschlecht und die Konzentration im Wesentlichen die Wirkung bestimmen. Die Daten können anhand vieler Standard-Statistiksoftwareanwendungen wie SPSS, SAS, STATA oder Genstat oder auch mit „R“ analysiert werden.

Durch die Analyse lässt sich die Varianz im Datensatz zwischen den Geschlechtern, zwischen den Konzentrationen und in Bezug auf die Wechselwirkungen zwischen den Geschlechtern und Konzentrationen partitionieren. Jede der Bedingungen wird anhand eines Schätzwerts der Varianz zwischen den Wiederholungsversuchstieren innerhalb der gleichgeschlechtlichen Tiergruppen überprüft, die die gleiche Konzentration erhalten haben. Die zugrundeliegende Methodik ist in vielen Standardwerken zur Statistik (siehe Referenzdokumente) und in den in Statistiksoftware-Paketen mitgelieferten Hilfe-Funktionen im Einzelnen beschrieben.

Die Analyse beginnt mit der Untersuchung der Interaktionsbedingung „Konzentration x Geschlecht“ anhand der ANOVA-Tabelle¹. Liegt keine signifikante Interaktion vor, liefern die kombinierten Werte für die Geschlechter oder Konzentrationen gültige statistische Tests für die jeweiligen Konzentrationen, und zwar basierend auf der ANOVA-Bedingung der innerhalb der Gruppe gepoolten Varianz.

Es folgt eine Partitionierung des Schätzwerts für die Varianzen zwischen den Konzentrationen in Kontraste, die einen Test für lineare und quadratische Kontraste aus den

¹ Statistiker, die mit einem Modellierungsansatz wie z. B. dem Ansatz der allgemeinen linearen Modelle (GLM) arbeiten, folgen bei der Analyse möglicherweise einem anderen, wenn auch vergleichbaren Ansatz, werden jedoch nicht notwendigerweise eine Herleitung der herkömmlichen Anova-Tabelle vornehmen, die auf algorithmische Lösungswege für statistische Berechnungen aus dem Vor-Computerzeitalter zurückgeht.

Reaktionen der verschiedenen Konzentrationen liefern. Ergibt sich hingegen eine signifikante Interaktion für die Bedingung „Konzentration x Geschlecht“, kann diese Bedingung auch in Interaktionskontraste „linearer Wert x Geschlecht“ und „quadratischer Wert x Geschlecht“ partitioniert werden. Diese Bedingungen liefern Tests dazu, ob die Reaktionen der jeweiligen Konzentrationen für die zwei Geschlechter parallel verlaufen oder ob es zu einer zwischen den Geschlechtern differenzierten Reaktion kommt.

Anhand des Schätzwerts für die innerhalb der Gruppen gepoolten Varianzen lassen sich paarweise Tests zu Abweichungen zwischen den Mittelwerten durchführen. Diese Vergleiche könnten zwischen den Mittelwerten für die beiden Geschlechter und zwischen den Mittelwerten für die verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden, beispielsweise um einen Vergleich mit den Negativkontrollen vorzunehmen. In Fällen mit signifikanter Interaktion können Vergleiche zwischen den Mittelwerten verschiedener Konzentrationen innerhalb eines Geschlechts oder zwischen den Mittelwerten beider Geschlechter bei gleicher Konzentration vorgenommen werden.

Referenzdokumente

Es sind viele Werke zur Statistik erhältlich, in denen die Theorie, der Aufbau, die Methodik, die Analyse und die Interpretation faktorieller Versuchspläne erörtert werden, von einfachen Zweifaktorenanalysen bis hin zu komplexeren Formen, wie sie in der „Design of Experiment“-Methode verwendet werden. Die folgende Auflistung ist nicht erschöpfend. Einige Bücher enthalten Beispielrechnungen zu vergleichbaren Versuchsplänen, in einigen Fällen auch mit einem Code zur Durchführung der Analysen unter Verwendung verschiedener Softwarepakete.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John

Wiley & Sons Inc.“

- (6) In Teil B wird Kapitel B.15 gestrichen.
- (7) In Teil B wird Kapitel B.16 gestrichen.
- (8) In Teil B wird Kapitel B.18 gestrichen.
- (9) In Teil B wird Kapitel B.19 gestrichen.
- (10) In Teil B wird Kapitel B.20 gestrichen.
- (11) In Teil B wird Kapitel B.24 gestrichen.

(12) In Teil B erhält Kapitel B.47 folgende Fassung:

„B.47 Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut zwecks Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 437 (2013). Der Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der Rinderhornhaut (Bovine Corneal Opacity and Permeability, BCOP) wurde vom Organisationsübergreifenden Koordinationsausschuss zur Validierung alternativer Methoden (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) unter Mitwirkung des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) und des Japanischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) in den Jahren 2006 und 2010 evaluiert (1) (2). Im Rahmen der ersten Evaluierung wurde der BCOP-Test im Hinblick auf seine Eignung zur Identifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) überprüft, die schwere Augenschäden verursachen (1). Im Rahmen der zweiten Evaluierung wurde der BCOP-Test im Hinblick auf seine Eignung zum Nachweis von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) überprüft, die nicht als augenreizende oder schwer augenschädigende Stoffe eingestuft wurden (2). Die BCOP-Validierungsdatenbank enthielt insgesamt 113 Stoffe und 100 Gemische (2)(3). Auf der Grundlage dieser Evaluierungen und zugehöriger Peer-Reviews wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass sich die Prüfmethode sowohl zum Nachweis von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) eignet, die schwere Augenschäden verursachen (Kategorie 1), als auch von Chemikalien, bei denen keine Einstufung aufgrund von Augenreizung oder schweren Augenschäden gemäß Definition im Globalen Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (4) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen¹ erforderlich ist, weshalb sie für beide Zwecke als wissenschaftlich gültig anerkannt wurde. Unter schweren

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

Augenschäden sind Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges zu verstehen, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Prüfchemikalien, die schwere Augenschäden hervorrufen, werden als Stoffe der UN-GHS-Kategorie 1 eingestuft. Chemikalien, die nicht als augenreizende oder schwer augenschädigende Stoffe eingestuft werden, sind als Stoffe definiert, die nicht den Anforderungen zur Einstufung in die UN-GHS-Kategorie 1 oder 2 (2A oder 2B) entsprechen, d. h. sie werden als Stoffe der UN-GHS-Kategorie „Keine Einstufung“ bezeichnet. Diese Prüfmethode berücksichtigt die empfohlenen Einsatzbereiche und Einsatzgrenzen des BCOP-Tests auf Grundlage der zugehörigen Evaluierungen. Zu den wichtigsten Unterschieden zwischen der ursprünglichen Fassung der OECD-Prüfrichtlinie aus dem Jahr 2009 und der aktualisierten Fassung von 2013 gehören u. a. die Verwendung der BCOP-Prüfmethode zur Identifizierung von Chemikalien, die keine Einstufung nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem erfordern (Nummern 2 und 7), Klarstellungen zur Anwendbarkeit der BCOP-Prüfmethode für die Prüfung von Alkoholen, Ketonen und Feststoffen (Nummern 6 und 7) sowie von Stoffen und Gemischen (Nummer 8), Klarstellungen zur Art der Prüfung von oberflächenaktiven Stoffen und tensidhaltigen Gemischen (Nummer 28), Aktualisierungen und Klarstellungen zu Positivkontrollen (Nummern 39 und 40), eine Aktualisierung der Entscheidungskriterien der BCOP-Prüfmethode (Nummer 47), eine Aktualisierung der Gültigkeitskriterien der Studie (Nummer 48), eine Aktualisierung der Bestandteile des Prüfberichts (Nummer 49), eine Aktualisierung der Anlage 1 zu Definitionen, die Ergänzung von Anlage 2 zur Vorhersagefähigkeit der BCOP-Prüfmethode unter verschiedenen Klassifizierungssystemen, eine Aktualisierung der Anlage 3 zur Liste der Leistungschemikalien und eine Aktualisierung der Anlage 4 zum BCOP-Hornhauthalter (Nummer 1) und zum Opazimeter (Nummern 2 und 3).

2. Gegenwärtig herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der In-vivo-Draize-Augentest in absehbarer Zukunft nicht durch einen einzigen In-vitro-Augenreizungstest ersetzt werden kann, der in der Lage ist, das gesamte Spektrum an Augenreizungen für verschiedene Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen ist es jedoch möglich, den Draize-Augentest durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen einer (gestuften) Prüfstrategie zu ersetzen (5). Der Top-Down-Ansatz (5) wird verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie ein hohes Reizpotenzial aufweist. Umgekehrt wird der Bottom-Up-Ansatz (5) verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie keine ausreichende Augenreizung erzeugt und somit keine Einstufung erfordert. Die BCOP-Prüfmethode ist eine In-vitro-Prüfmethode, die unter bestimmten Bedingungen und mit bestimmten Grenzen zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien mit augengefährdender Wirkung angewendet werden kann. Auch wenn der Test den In-vivo-Kaninchenaugentest nicht absolut ersetzen kann,

wird die BCOP-Prüfmethode als erster Schritt im Rahmen einer Prüfstrategie wie des von Scott et al. vorgeschlagenen Top-Down-Ansatzes (5) empfohlen, um ohne weitere Tests (4) schwer augenschädigende Chemikalien, d. h. Chemikalien, die in die UN-GHS-Kategorie 1 einzustufen sind, zu identifizieren. Die BCOP-Prüfmethode wird auch für die Identifizierung von Chemikalien empfohlen, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß UN-GHS („Keine Einstufung“) (4) erfordern, und kann daher im Rahmen einer Prüfstrategie z. B. mit Bottom-up-Ansatz verwendet werden (5). Im Falle einer Chemikalie, bei der anhand der BCOP-Prüfmethode nicht vorhergesagt werden kann, dass sie schwere Augenschäden verursacht oder keine Einstufung als augenreizend/schwer augenschädigend erfordert, müssten jedoch weitere Tests (in vitro und/oder in vivo) durchgeführt werden, um eine eindeutige Einstufung vornehmen zu können.

3. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte für die Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie, gemessen als ihre Fähigkeit, bei isolierten Rinderhornhäuten Trübungs- und verstärkte Durchlässigkeitseffekte hervorzurufen. Toxische Effekte für die Hornhaut sind messbar durch: i) verminderte Lichtübertragung (Trübung) und ii) den verstärkten Durchtritt von Fluorescein-Natrium-Farbstoff (Durchlässigkeit). Die Trübungs- und Durchlässigkeitsbewertungen der Hornhaut nach Applikation einer Prüfchemikalie ergeben in Kombination einen In-Vitro-Reizwert (In Vitro Irritancy Score, IVIS), der für die Einstufung des Reizpotenzials der Prüfchemikalie maßgeblich ist.
4. Definitionen sind Anlage 1 zu entnehmen.

VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

5. Diese Prüfmethode basiert auf dem BCOP-Testprotokoll des Organisationsübergreifenden Koordinationsausschusses zur Validierung alternativer Methoden (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (6)(7), das ursprünglich auf Informationen des Instituts für In-vitro- Forschung (Institute for In Vitro Sciences, IIVS) und auf dem INVITTOX-Protokoll 124 (8) beruht. Letzteres Protokoll wurde für die von der Europäischen Gemeinschaft finanzierte Prävalidierungsstudie aus den Jahren 1997-1998 herangezogen. Beide Protokolle beruhen auf der BCOP-Prüfmethodik, wie sie von Gautheron et al. (9) erstmals beschrieben wurde.
6. Die BCOP-Prüfmethode kann zur Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien gemäß UN-GHS-Definition, d. h. Chemikalien, die in die UN-GHS-Kategorie 1 einzustufen sind, angewendet werden (4). Gemessen an Daten aus In-vivo-Kaninchenaugentests, die nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem eingestuft wurden, weist die BCOP-Prüfmethode für diesen Zweck eine allgemeine Genauigkeit von 79 % (150/191), eine Falsch-Positiv-Rate von 25 % (32/126) und eine Falsch-Negativ-Rate von

14 % (9/65) auf (3) (siehe Anlage 2, Tabelle 1). Werden Prüfchemikalien einer bestimmten Chemikalienklasse (Alkohole, Ketone) oder mit bestimmten physikalischen Eigenschaften (Feststoffe) aus der Datenbank ausgeschlossen, so liegt die allgemeine Genauigkeit der BCOP-Prüfmethode gemessen am UN-GHS-Klassifizierungssystem bei 85 % (111/131), die Falsch-Positiv-Rate bei 20 % (16/81) und die Falsch-Negativ-Rate bei 8 % (4/50) (3). Potenzielle Mängel der BCOP-Prüfmethode bei der Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-Kategorie 1) gründen auf hohen Falsch-Positiv-Raten für Alkohole und Ketone und hohen Falsch-Negativ-Raten für Feststoffe, die in den Validierungsdaten beobachtet wurden (1)(2)(3). Da jedoch nicht für alle Alkohole und Ketone durch die BCOP-Prüfmethode zu hohe Werte vorhergesagt werden und einige korrekt als Stoffe der UN-GHS-Kategorie 1 eingestuft werden, werden diese beiden organischen funktionellen Gruppen nicht als Stoffe außerhalb des Anwendungsbereichs dieser Prüfmethode betrachtet. Es muss also bei der Anwendung dieser Prüfmethode entschieden werden, ob eine gegebenenfalls zu hohe Vorhersage für einen Alkohol oder ein Keton vertretbar ist oder ob weitere Tests mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz durchgeführt werden sollten. Bezüglich der Falsch-Negativ-Raten für Feststoffe ist zu beachten, dass Feststoffe beim In-vivo-Draize-Augenreizungstest zu variablen und extremen Expositionsbedingungen führen können, aus denen sich möglicherweise irrelevante Vorhersagen über das tatsächliche Reizungspotenzial ableiten (10). Es ist ferner zu beachten, dass keine der Falsch-Negativ-Raten, die in den ICCVAM-Validierungsdaten (2)(3) im Zusammenhang mit der Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-Kategorie 1) festgestellt wurden, im Ergebnis zu einem $IVIS \leq 3$ führten, dem Kriterium zur Identifizierung einer Prüfchemikalie als Stoff der UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“. Des Weiteren gelten Falsch-Negativ-Raten der BCOP-Prüfmethode in diesem Zusammenhang nicht als kritisch, da alle Prüfchemikalien mit einem Wert von $3 < IVIS \leq 55$ nachfolgend, je nach den gesetzlichen Anforderungen und unter Verwendung einer sequentiellen Prüfstrategie mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz, anhand weiterer, angemessen validierter In-vitro-Tests oder als letzte Option an Kaninchen getestet werden würden. Angesichts der Tatsache, dass einige feste Chemikalien anhand der BCOP-Prüfmethode korrekterweise als Stoffe der UN-GHS-Kategorie 1 vorhergesagt werden, wird auch nicht davon ausgegangen, dass diese physikalischen Eigenschaften außerhalb des Anwendungsbereichs dieser Prüfmethode liegen. Prüfer können diese Prüfmethode für alle Arten von Chemikalien einsetzen und ein $IVIS$ -Wert > 55 sollte als Indikator für eine schwer augenschädigende Wirkung gelten, nach der eine Einstufung in UN-GHS-Kategorie 1 ohne weitere Tests vorzunehmen ist. Wie bereits erwähnt, sollten Positivergebnisse bei Verwendung von Alkoholen oder Ketonen angesichts des Risikos der Vorhersage zu hoher Werte jedoch mit einer gewissen Zurückhaltung interpretiert werden.

7. Die BCOP-Prüfmethode kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN-GHS-Klassifizierungssystem erfordern (4). Gemessen an Daten aus In-vivo-Kaninchenaugentests, die nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem eingestuft wurden, weist die BCOP-Prüfmethode für diesen Zweck eine allgemeine Genauigkeit von 69 % (135/196), eine Falsch-Positiv-Rate von 69 % (61/89) und eine Falsch-Negativ-Rate von 0 % (0/107) auf (3) (siehe Anlage 2, Tabelle 2). Die erhaltene Falsch-Positiv-Rate (In-vivo-Chemikalien der UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“ mit einem IVIS-Wert > 3 , siehe Nummer 47) ist zwar recht hoch, gilt in diesem Zusammenhang jedoch nicht als kritisch, da alle Prüfchemikalien mit einem Wert von $3 < \text{IVIS} \leq 55$ nachfolgend, je nach den gesetzlichen Anforderungen und unter Verwendung einer sequentiellen Prüfstrategie mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz, anhand weiterer, angemessen validierter In-vitro-Tests oder als letzte Option an Kaninchen getestet werden würden. Die BCOP-Prüfmethode weist keine nennenswerten Mängel für die Untersuchung von Alkoholen, Ketonen und Feststoffen auf, sofern das Ziel die Identifizierung von Chemikalien ist, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“) erfordern (3). Prüfer können diese Prüfmethode jedoch für alle Arten von Chemikalien einsetzen, und ein Negativergebnis ($\text{IVIS} \leq 3$) sollte als Indikator dafür gelten, dass keine Einstufung vorzunehmen ist (UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“). Da mit der BCOP-Prüfmethode nur 31 % der Chemikalien richtig identifiziert werden können, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern, sollte diese Prüfmethode nicht die erste Wahl sein, wenn als erster Schritt ein Bottom-up-Ansatz verwendet werden soll (5), sofern andere validierte und akzeptierte In-vitro-Verfahren mit ähnlich hoher Empfindlichkeit, jedoch einer höheren Spezifität zur Verfügung stehen.
8. Die BCOP-Validierungsdatenbank enthielt insgesamt 113 Stoffe und 100 Gemische (2)(3). Die BCOP-Prüfmethode gilt demnach als für die Prüfung von Stoffen und Gemischen gleichermaßen anwendbar.
9. Aufgrund der beträchtlichen Anzahl von Chemikalien der UN-GHS-Kategorie 1, die zu niedrig in die UN-GHS-Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft sind, und von Chemikalien, die keine Einstufung erfordern, jedoch zu hoch in die UN-GHS-Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft sind, wird die BCOP-Prüfmethode nicht für die Identifizierung von Prüfchemikalien empfohlen, die als augenreizend (d. h. UN-GHS-Kategorie 2 oder Kategorie 2A) oder leicht augenreizend (UN-GHS-Kategorie 2B) eingestuft werden sollten (2)(3). Diesbezüglich können weitere Tests mit einer anderen geeigneten Methode erforderlich sein.
10. Bei allen Verfahren, die Rinderaugen und Rinderhornhäute involvieren, sollten die geltenden Regeln und Verfahrensvorschriften der Prüfanstalt für den Umgang mit

Tiermaterial (u. a. Gewebe und Gewebeflüssigkeiten) eingehalten werden. Universelle Laborregeln sollten beachtet werden (11).

11. Bindehaut- und Irisverletzungen werden bei der BCOP-Prüfmethode zwar außer Acht gelassen, doch werden Auswirkungen auf die Hornhaut berücksichtigt, die wesentliche Einflussfaktoren für die In-vivo-Klassifizierung nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem bilden. Die Reversibilität von Hornhautläsionen lässt sich per se mit der BCOP-Prüfmethode nicht beurteilen. Doch wurde ausgehend von Kaninchenaugenstudien vorgeschlagen, eine Bewertung der anfänglichen Tiefe der Hornhautverletzung heranzuziehen, um einige Arten irreversibler Wirkungen zu identifizieren (12). Allerdings sind weitere wissenschaftliche Erkenntnisse erforderlich, um zu verstehen, wie irreversible Wirkungen auftreten, die nicht mit einer anfänglichen starken Verletzung im Zusammenhang stehen. Schließlich sei auch erwähnt, dass das Potenzial für eine mit der Augenexposition verbundene systemische Toxizität nach der BCOP-Methode nicht bewertet werden kann.
12. Diese Prüfmethode wird regelmäßig aktualisiert, um neue Informationen und Daten zu berücksichtigen. Beispielsweise können histopathologische Befunde potenziell nützlich sein, wenn eine umfassendere Charakterisierung der Hornhautschädigung erforderlich ist. Wie im OECD-Leitfaden Nr. 160 (13) umrissen, sollten Anwender Hornhäute aufbewahren und histopathologische Proben zubereiten, die zum Aufbau einer Datenbank und zur Entwicklung von Entscheidungskriterien herangezogen werden können, mit denen sich die Genauigkeit dieser Prüfmethode weiter verbessern lässt.
13. Laboratorien, die diese Prüfmethode zum ersten Mal anwenden, sollten die in Anlage 3 genannten Leistungskemikalien verwenden. Laboratorien können diese Chemikalien verwenden, um ihre technische Kompetenz zur Durchführung der BCOP-Prüfmethode nachzuweisen, bevor sie BCOP-Testdaten für Zwecke der vorschriftsmäßigen Gefahrenklassifizierung einreichen.

TESTPRINZIP

14. Die BCOP-Prüfmethode ist ein organtypisches Modell, das die normalen physiologischen und biochemikalischen Funktionen von Rinderhornhäuten in vitro kurzfristig aufrechterhält. Bei dieser Methode werden durch die Prüfchemikalie hervorgerufene Schäden bewertet, indem Veränderungen von Trübung und Durchlässigkeit der Hornhaut mithilfe eines Opazimeters bzw. eines VIS-Spektrofotometers quantitativ gemessen werden. Die beiden Messwerte dienen der Berechnung eines In-vitro-Reizwertes (IVIS), der seinerseits herangezogen wird, um zwecks Prädiktion des Augenreizpotenzials einer Prüfchemikalie am lebenden Objekt (in vivo) eine Zuordnung zu einer Gefahrenkategorie aufgrund des In-vitro-Reizungspotenzials des Stoffes vorzunehmen (siehe Entscheidungskriterien unter Nummer 48).

15. Für die BCOP-Prüfmethode werden isolierte Hornhäute der Augen frisch geschlachteter Rinder verwendet. Die Hornhauttrübung wird quantitativ bestimmt als Menge der die Hornhaut durchdringenden Lichtstrahlung. Die Durchlässigkeit der Hornhaut wird quantitativ bestimmt als die Menge an Natrium-Fluorescein, die die gesamte Dicke der Hornhaut durchdringt und im Medium in der Hinterkammer nachgewiesen wird. Die Applikation der Prüfchemikalien auf die Epitheloberfläche der Hornhaut erfolgt durch Zugabe der Stoffe in die Vorderkammer des Hornhauthalters. Anlage 4 enthält eine Beschreibung sowie ein Schaubild einer Halterung, wie sie für die BCOP-Prüfmethode verwendet wird. Hornhauthalter sind im Handel erhältlich oder können als Bausatz bezogen werden.

Bezugsquelle und Alter der Rinderaugen und Auswahl der Tiere

16. Schlachtrinder werden in der Regel für den menschlichen Verzehr oder für andere gewerbliche Zwecke getötet. Nur gesunde und für die menschliche Nahrungskette geeignet befundene Tiere kommen als Bezugsquelle für Augenhornhäute für den BCOP-Test in Frage. Da Rinder je nach Rasse, Alter und Geschlecht eine große Gewichtsspanne aufweisen, gibt es keine Gewichtsempfehlung für die Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung.

17. Augenhornhäute von Tieren verschiedener Altersklassen sind mitunter unterschiedlich groß. Hornhäute mit einem horizontalen Durchmesser $> 30,5$ mm und einer zentralen Hornhautdicke (CCT) mit Werten ≥ 1100 μm stammen in der Regel von über acht Jahre alten Rindern, während Hornhäute mit einem horizontalen Durchmesser $< 28,5$ mm und CCT-Werten < 900 μm im Allgemeinen von weniger als fünf Jahre alten Tieren stammen (14). Deshalb werden Augen von über 60 Monate alten Tieren in der Regel nicht verwendet. Traditionsgemäß werden keine Augen von weniger als 12 Monate alten Rindern verwendet, da die Augen dieser Tiere noch nicht ausgewachsen sind und Hornhautdicke sowie Hornhautdurchmesser wesentlich kleiner sind als bei ausgewachsenen Rindern. Hornhäute von Jungtieren (d. h. Tiere im Alter von sechs bis 12 Monaten) sind aufgrund ihrer Vorteile jedoch zulässig: Sie sind beispielsweise leichter erhältlich, die Altersspanne ist geringer und das Laborpersonal ist in geringerem Maße BSE-gefährdet (15). Da eine weitere Evaluierung des Einflusses von Hornhautgröße oder Hornhautdicke auf die Wirkung verätzender oder reizender Stoffe nützlich wäre, sollten Anwender das geschätzte Alter und/oder das Gewicht der Tiere, von denen die für eine Studie verwendeten Hornhäute stammen, mitteilen.

Gewinnung und Beförderung der Augen zum Labor

18. Die Augen werden im Schlachthof gewonnen. Um jede mechanische und sonstige Schädigung der Augen auf ein Minimum zu beschränken, sollten die Augen nach der Tötung des Tieres so bald wie möglich ausgeschält und unmittelbar danach sowie

während der Beförderung gekühlt werden. Damit die Augen nicht mit potenziellen Reizstoffen in Berührung kommen, sollte das Schlachthofpersonal zum Abspülen des Schädels keine Detergenzien verwenden.

19. Die Augen sollten in einem angemessen großen Behältnis vollständig in HBSS eingelegt und so zum Labor befördert werden, dass sich ihr Zustand möglichst nicht verschlechtert und/oder es möglichst nicht zu einer bakteriellen Kontamination kommt. Da die Augen während des Schlachtprozesses gewonnen werden, könnten sie mit Blut und anderen biologischen Stoffen wie Bakterien und sonstigen Mikroorganismen in Berührung kommen. Deshalb muss unbedingt sichergestellt werden, dass das Kontaminationsrisiko auf ein Mindestmaß begrenzt wird (z. B. indem das für die Beförderung der Augen verwendete Behältnis auf Nasseis gelagert und die zur Lagerung der Augen während der Beförderung verwendete HBSS-Lösung mit Antibiotika (z. B. 100 IU/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin) angereichert wird).
20. Der Zeitabstand zwischen der Gewinnung der Augen und der Verwendung der Hornhäute im BCOP-Test sollte möglichst gering sein (im Idealfall sollten die Hornhäute am selben Tag gewonnen und verwendet werden) und die Testergebnisse nachweislich nicht kompromittieren. Letztere basieren auf den Auswahlkriterien für die Augen sowie auf den Reaktionen der Positiv- und Negativkontrollen. Alle für die Prüfung verwendeten Augen sollten aus einer an ein und demselben Tag gewonnenen Partie Augen stammen.

Auswahlkriterien für Augen, die im BCOP-Test eingesetzt werden

21. Unmittelbar nach ihrer Ankunft im Labor werden die Augen sorgfältig auf Mängel wie unter anderem verstärkte Trübung, Kratzer und Neovaskularisation untersucht. Nur Hornhäute von Augen, die keine derartigen Mängel aufweisen, dürfen verwendet werden.
22. Die Qualität jeder Hornhaut wird auch in späteren Testphasen geprüft. Hornhäute, die nach einer ersten einstündigen Äquilibration mehr als sieben Trübungseinheiten oder einen vergleichbaren Wert für das verwendete Opazimeter und die verwendeten Hornhauthalterungen aufweisen (ANMERKUNG: der Opazimeter sollte nach den Trübungsnormen kalibriert werden, die auch zur Festlegung der Trübungseinheiten verwendet werden; siehe Anlage 4), sind zu verwerfen.
23. Jede Behandlungsgruppe (Prüfchemikalie sowie gleichzeitige Negativ- und Positivkontrollen) umfasst mindestens drei Augen. Für die Negativkontrollen des BCOP-Tests sollten drei Hornhäute verwendet werden. Da die Hornhäute operativ vom Augapfel entfernt und in die Hornhautkammern eingespannt werden, kann es infolge dieser Handgriffe bei einzelnen Hornhäuten zu veränderten Trübungs- und Durchlässigkeitswerten kommen (auch bei der Negativkontrolle). Außerdem werden die Trübungs- und Durchlässigkeitswerte von Hornhäuten der Negativkontrolle dazu verwendet, die Trübungs- und Durchlässigkeitswerte der mit der Prüfchemikalie

behandelten Hornhäute und der Hornhäute der Positivkontrolle bei den IVIS-Berechnungen zu korrigieren.

VERFAHREN

Vorbereitung der Augen

24. Unbeschädigte Hornhäute werden seziiert, wobei ein 2 bis 3 mm breiter Sklera-Rand belassen wird, um das anschließende Manipulieren zu erleichtern; dabei ist darauf zu achten, dass die Epithel- und Endothelzellschicht der Hornhaut nicht beschädigt wird. Die isolierten Hornhäute werden in speziell entwickelte Hornhauthalter eingespannt, die aus Vorder- und Hinterkammern bestehen, welche die Schnittstellen zur Epithel- bzw. Endothelseite der Hornhäute bilden. Beide Kammern (Hinterkammer zuerst) werden bis zum Überlaufen mit vorgewärmtem phenolrotfreiem EMEM-Medium gefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass sich keine Luftblasen bilden. Das Gerät wird sodann bei $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens eine Stunde äquilibriert, um die Hornhäute mit dem Medium zu äquilibrieren und so weit wie möglich eine normale Stoffwechseltätigkeit zu gewährleisten (die ungefähre Temperatur der Hornhautoberfläche beträgt in vivo $32 \text{ }^\circ\text{C}$).
25. Nach der Äquilibration wird frisches vorgewärmtes, phenolrotfreies EMEM-Medium in beide Kammern gegeben, und für jede Hornhaut werden Referenztrübungswerte abgelesen. Hornhäute, die makroskopische Gewebeschäden (z. B. Kratzer, Pigmentierung, Neovaskularisation) oder über sieben Trübungseinheiten bzw. einen für das verwendete Opazimeter und die verwendeten Hornhauthalterungen vergleichbaren Wert aufweisen, werden verworfen. Mindestens drei Hornhäute werden für die Negativ- (oder Lösungsmittel-)Kontrolle ausgewählt. Die restlichen Hornhäute werden in Behandlungs- und Positivkontrollgruppen aufgeteilt.
26. Da die Wärmekapazität von Wasser höher ist als die Wärmekapazität von Luft, bietet Wasser stabilere Temperaturbedingungen für die Inkubation. Deshalb wird ein Wasserbad empfohlen, um Hornhauthalter samt Inhalt auf einer Temperatur von $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ zu halten. Es können jedoch auch Luftinkubatoren verwendet werden, sofern alle erforderlichen Vorkehrungen getroffen wurden, um die Temperatur stabil zu halten (z. B. durch Vorwärmen der Halterungen und Medien).

Applikation der Prüfchemikalie

27. Es werden zwei unterschiedliche Behandlungsprotokolle verwendet – eines für Flüssigkeiten und Tenside (Feststoffe oder Flüssigkeiten) und eines für nichttensidische Feststoffe.
28. Flüssigkeiten werden unverdünnt, halbfeste Stoffe, Cremes und Wachse werden in der Regel als Flüssigkeiten getestet. Unverdünnte Tenside werden in einer Konzentration von

10 % w/v in 0,9 % Natriumchloridlösung, destilliertem Wasser oder einem anderen Lösungsmittel, welches das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigt, getestet. Sofern alternative Lösungskonzentrationen verwendet werden, ist dies angemessen zu begründen. Tensidhaltige Gemische können unverdünnt getestet oder zunächst auf eine geeignete Konzentration entsprechend der jeweiligen In-vivo-Exposition verdünnt werden. Die getestete Konzentration ist angemessen zu begründen. Die Hornhäute werden den Flüssigkeiten und Tensiden für die Dauer von zehn Minuten ausgesetzt. Bei anderen Expositionszeiten sollten diese wissenschaftlich begründet werden. Vgl. Anlage 1 bezüglich einer Definition für „Tensid“ und „tensidhaltiges Gemisch“.

29. Nichttensidische Feststoffe werden in der Regel als Lösungen oder Suspensionen in einer Konzentration von 20 % w/v in 0,9 % Natriumchloridlösung, destilliertem Wasser oder einem anderem Lösungsmittel, welches das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigt, getestet. Unter bestimmten Bedingungen und sofern wissenschaftlich begründet, können Feststoffe auch unverdünnt durch direkte Applikation auf die Hornhautoberfläche getestet werden, wobei die offene Methode (open chamber method, siehe Nummer 32) angewandt wird. Die Hornhäute werden den Feststoffen für die Dauer von vier Stunden ausgesetzt; soweit wissenschaftlich fundiert können jedoch auch, wie bei Flüssigkeiten und Tensiden, alternative Expositionszeiten verwendet werden.
30. Je nach den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie (z. B. fest, flüssig, zähflüssig oder nicht zähflüssig) können unterschiedliche Behandlungsmethoden angewandt werden. Der kritische Faktor besteht darin sicherzustellen, dass die Prüfchemikalie die Epitheloberfläche angemessen bedeckt und während der Spülungen sachgemäß entfernt wird. Die geschlossene Methode (closed chamber method) wird in der Regel für nicht zähflüssige bis leicht zähflüssige Prüfchemikalien eingesetzt, während die offene Methode eher für halbzähflüssige und zähflüssige Prüfchemikalien sowie für unverdünnte Feststoffe verwendet wird.
31. Bei der geschlossenen Methode wird über die Dosieröffnungen auf der Oberseite der Kammer so viel Prüfchemikalie (750 µl) in die Vorderkammer gegeben, dass die Epithelseite der Hornhaut bedeckt ist; die Öffnungen werden anschließend für die gesamte Expositionsdauer mit den Kammerverschlüssen abgedichtet. Es muss unbedingt sichergestellt werden, dass alle Hornhäute der Prüfchemikalie für eine angemessene Dauer ausgesetzt werden.
32. Bei der offenen Methode werden vor der Behandlung Scheibenverschlussring und Glasscheibe von der Vorderkammer entfernt. Die Kontroll- oder die Prüfchemikalie (750 µl bzw. genügend Prüfchemikalie, um die Hornhaut komplett zu bedecken) wird mit einer Mikropipette direkt auf die Epitheloberfläche der Hornhaut appliziert. Erweist sich das Pipettieren einer Prüfchemikalie als schwierig, so kann diese zur leichteren Dosierung mittels Druckausgleich in eine Direktverdrängungspipette geladen werden. Die Spitze der Direktverdrängungspipette wird in die Dosierspitze der Spritze eingeführt,

damit das Material unter Druck in die Spitze der Verdrängungspipette geladen werden kann. Lässt man den Bedienknopf langsam zurückgleiten, fährt der Kolben der Pipette nach oben. Treten in der Pipettenspitze Luftbläschen auf, wird die Prüfchemikalie verworfen (ausgestoßen) und der Prozess wird so lange wiederholt, bis die Spitze ohne Luftblasen gefüllt ist. Erforderlichenfalls kann eine normale Spritze (ohne Nadel) verwendet werden, denn sie gestattet das Abmessen einer akkuraten Menge Prüfchemikalie und erleichtert die Applikation auf die Epitheloberfläche der Hornhaut. Nach der Dosierung wird die Glasscheibe wieder auf die Vorderkammer gesetzt, um das System wieder zu schließen.

Inkubation nach der Exposition

33. Nach Ablauf der Expositionszeit werden Prüfchemikalie, Negativkontrolle oder Positivkontrolle aus der Vorderkammer entfernt, und das Epithel wird mindestens drei Mal (oder bis keine Prüfchemikalie mehr sichtbar ist) mit (phenolrothaltigem) EMEM-Medium gewaschen. Phenolrot wird zum Abspülen verwendet, da sich aufgrund der Farbveränderung bei Phenolrot die Wirksamkeit des Abspülens saurer oder alkalischer Prüfchemikalien bestimmen lässt. Die Hornhäute werden mehr als drei Mal gewaschen, wenn die Farbveränderung (ins Gelbe oder Lila) anhält oder wenn die Prüfchemikalie nach wie vor sichtbar ist. Sobald das Medium frei von der Prüfchemikalie ist, werden die Hornhäute ein letztes Mal mit EMEM-Medium (ohne Phenolrot) abgespült. Das EMEM-Medium (ohne Zusatz von Phenolrot) wird als letzte Spülung verwendet, um sicherzustellen, dass der Phenolrot-Farbstoff vor der Trübungsmessung aus der Vorderkammer entfernt wurde. Die Vorderkammer wird sodann wieder mit nicht phenolrothaltigem frischem EMEM-Medium aufgefüllt.
34. Bei Flüssigkeiten oder Tensiden werden die Hornhäute nach dem Abspülen für weitere zwei Stunden bei 32 ± 1 °C inkubiert. Unter bestimmten Umständen könnte sich nach der Exposition eine längere Inkubationszeit als zweckdienlich erweisen; dies sollte auf Fallbasis geprüft werden. Mit Feststoffen behandelte Hornhäute werden nach Ablauf der vierstündigen Exposition gründlich abgespült; eine längere Inkubation ist nicht erforderlich.
35. Nach Ablauf der auf die Exposition folgenden Inkubation (Flüssigkeiten und Tenside) bzw. nach Ablauf der vierstündigen Exposition (nichttensidische Feststoffe) werden Trübung und Durchlässigkeit der einzelnen Hornhäute aufgezeichnet. Außerdem wird jede Hornhaut visuell geprüft, und relevante Befunde (z. B. Gewebeabschälung, Reste der Prüfchemikalie, uneinheitliche Trübungsmuster) werden aufgezeichnet. Diese Daten könnten insofern wichtig sein, als sie Abweichungen der Opazimeter-Messwerte bestätigen könnten.

Kontrollchemikalien

36. Jeder Versuch beinhaltet gleichzeitige Negativ- oder Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen und Positivkontrollen.
37. Für Tests von Flüssigstoffen zu 100 % sieht der BCOP-Test eine gleichzeitige Negativkontrolle (z. B. 0,9 % Natriumchloridlösung oder destilliertes Wasser) vor, damit unspezifische Veränderungen im Testsystem festgestellt werden können und ein Referenzwert für die Test-Endpunkte ermittelt werden kann. Auf diese Weise wird auch sichergestellt, dass die Testbedingungen nicht zu einer unerwünschten Reizwirkung führen.
38. Für Tests von verdünnten Flüssigkeiten, Tensiden oder Feststoffen sieht der BCOP-Test eine Gruppe gleichzeitiger Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen vor, damit unspezifische Veränderungen im Testsystem festgestellt werden können und ein Referenzwert für die Test-Endpunkte ermittelt werden kann. Es sind nur Lösungsmittel/Vehikel zulässig, die das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigen.
39. Jeder Versuch beinhaltet als gleichzeitige Positivkontrolle eine bekannte augenreizende Chemikalie, damit die Integrität des Testsystems und seine korrekte Durchführung überprüft werden können. Um sicherzustellen, dass im Zeitverlauf auftretende Wirkungsschwankungen bei der Positivkontrolle bewertet werden können, sollte die Reaktion jedoch nicht zu heftig sein.
40. Beispiele für Positivkontrollen für flüssige Prüfchemikalien sind 100 %iges Ethanol oder 100 %iges Dimethylformamid. Für feste Prüfchemikalien käme 20 %iges (Gewichtsprozent) Imidazol in 0,9 % Natriumchloridlösung als Positivkontrolle in Frage.
41. Referenzchemikalien sind nützlich für die Evaluierung des Augenreizpotenzials unbekannter Chemikalien einer bestimmten Chemikalien- oder Produktklasse oder zur Evaluierung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

Gemessene Endpunkte

42. Die Trübung wird durch Messung der durch die Hornhaut durchgehenden Lichtstrahlung bestimmt. Die quantitative Messung der Hornhauttrübung erfolgt mithilfe eines Opazimeters, eines Messgeräts, bei dem die Trübungswerte kontinuierlich gemessen werden.
43. Die Durchlässigkeit wird durch Messung der Menge Fluorescein-Natrium bestimmt, die alle Zellschichten der Hornhaut (d. h. von der Epithelzellschicht auf der äußeren Hornhautoberfläche bis zur Endothelzellschicht auf der inneren Hornhautfläche) passiert. Die Vorderkammer des Hornhauthalters, die die Verbindung zur Epithelseite der Hornhaut bildet, wird mit 1 ml Fluorescein-Natrium-Lösung (4 oder 5 mg/ml bei Flüssigkeiten und Tensiden bzw. nichttensidischen Feststoffen) aufgefüllt, während die Hinterkammer, die die Verbindung zur Endothelseite der Hornhaut bildet, mit frischem

EMEM-Medium gefüllt wird. Die Halterung wird sodann in horizontaler Position für 90 ± 5 Minuten bei 32 ± 1 °C inkubiert. Die Menge an Fluorescein-Natrium, die in die Hinterkammer eindringt, wird mithilfe eines UV/VIS-Spektrofotometers gemessen. Bei 490 nm ausgewertete spektrofotometrische Messungen werden als Werte für optische Dichte (OD_{490}) oder Absorbanzwerte aufgezeichnet, die kontinuierlich gemessen werden. Zur Bestimmung der Fluorescein-Durchlässigkeit werden OD_{490} -Werte herangezogen, die mithilfe eines VIS-Spektrofotometers bei einer Standardpfadlänge von 1 cm ermittelt wurden.

44. Alternativ kann ein Plattenleser für 96-Mulden-Mikrotiterplatten verwendet werden, sofern i) der lineare Messbereich des Plattenlesers für die Bestimmung der Fluorescein- OD_{490} -Werte festgelegt werden kann und ii) in der 96-Mulden-Mikrotiterplatte Fluorescein-Proben in der richtigen Menge verwendet werden, um OD_{490} -Werte zu ergeben, die der Standardpfadlänge von 1 cm entsprechen (dies könnte vollständig gefüllte Mulden [in der Regel 360 µl] erfordern).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

45. Sobald die Trübungs- und die mittleren Durchlässigkeits- (OD_{490} -)Werte um die Hintergrundtrübungswerte und die OD_{490} -Durchlässigkeitswerte der Negativkontrolle korrigiert wurden, werden die mittleren Trübungs- und OD_{490} -Durchlässigkeitswerte für jede Behandlungsgruppe in einer empirisch abgeleiteten Formel kombiniert, um für jede Behandlungsgruppe einen In-vitro-Reizwert (IVIS) zu berechnen:

$$\text{IVIS} = \text{mittlerer Trübungswert} + (15 \times \text{mittlerer } OD_{490}\text{-Durchlässigkeitswert})$$

46. Nach Sina et al. (16) wurde diese Formel aus Labor- und Interlaborstudien abgeleitet. Die für eine Serie von 36 Verbindungen in einer Multilaborstudie generierten Daten wurden einer multivariaten Analyse unterzogen, um die Best-fit-Gleichung zwischen In-vivo- und In-vitro-Daten zu ermitteln. Diese Analyse wurde von Wissenschaftlern zweier separater Unternehmen durchgeführt, die zu quasi identischen Gleichungsergebnissen gelangten.
47. Die Trübungs- und Durchlässigkeitswerte sollten auch unabhängig voneinander bestimmt werden, um feststellen zu können, ob eine Prüfchemikalie für nur einen der beiden Endpunkte (siehe Entscheidungskriterien) eine augenverätzende oder stark augenreizende Wirkung verursachte.

Entscheidungskriterien

48. Die IVIS-Schwellenwerte zur Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-Kategorie 1) und Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern (UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“) sind nachfolgend aufgeführt:

IVIS	UN-GHS
≤ 3	Keine Einstufung
$> 3; \leq 55$	Keine Vorhersage möglich
> 55	Kategorie 1

Studienakzeptanzkriterien

49. Ein Test gilt als akzeptabel, wenn die Positivkontrolle einen IVIS-Wert innerhalb von zwei Standardabweichungen des geltenden historischen Mittelwertes ergibt, der mindestens alle drei Monate bzw. immer dann aktualisiert werden muss, wenn Laboratorien, die nur selten Testungen vornehmen (d. h. weniger als einmal im Monat), einen akzeptablen Test durchführen. Die Negativ- oder Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollten Trübungs- und Durchlässigkeitswerte ergeben, die geringer sind als die Obergrenzen, die für Hintergrundtrübungs- und Durchlässigkeitswerte für Rinderhornhäute vorgegeben sind, welche mit der jeweiligen Negativ- bzw. Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle behandelt wurden. Kann eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden, so ist ein einziger Testlauf, der aus mindestens drei Hornhäuten besteht, ausreichend. Kommt es jedoch im ersten Testlauf zu grenzwertigen Ergebnissen, sollte ein zweiter Testlauf in Erwägung gezogen werden (ist jedoch nicht unbedingt erforderlich) und darüber hinaus ein dritter, sollte es beim ersten und zweiten Testlauf zu abweichenden mittleren IVIS-Ergebnissen kommen. In diesem Zusammenhang gilt ein Ergebnis im ersten Testlauf als grenzwertig, wenn die Vorhersagen aus den 3 Hornhäuten nicht übereinstimmend waren, und zwar wie folgt:

- 2 der 3 Hornhäute ergaben Vorhersagen, die mit dem Mittelwert aller 3 Hornhäute nicht übereinstimmen, ODER
- 1 der 3 Hornhäute ergab eine Vorhersage, die mit dem Mittelwert aller 3 Hornhäute nicht übereinstimmt, UND das nicht-übereinstimmende Ergebnis lag mehr als 10 IVIS-Einheiten über dem Schwellenwert von 55.
- Bestätigt die Vorhersage aus dem Wiederholungstestlauf das Ergebnis des ersten Testlaufs (basierend auf dem mittleren IVIS-Wert), kann eine endgültige Entscheidung getroffen werden, ohne weitere Tests durchzuführen. Ergibt der Wiederholungstestlauf

eine mit dem ersten Testlauf nicht übereinstimmende Vorhersage (basierend auf dem mittleren IVIS-Wert), sollte ein dritter und letzter Testlauf erfolgen, um nicht eindeutige Vorhersagen zu klären und die Prüfchemikalie einzustufen. Wenn eine Prüfchemikalie in einem Testlauf nach der Vorhersage in die UN-GHS-Kategorie 1 einzustufen ist, kann von weiteren Tests zur Klassifizierung und Kennzeichnung abgesehen werden.

Prüfbericht

50. Der Prüfbericht sollte die folgenden Informationen umfassen, soweit sie für die Studie relevant sind:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

- chemische Bezeichnung(en) wie der vom Chemical Abstracts Service (CAS) benutzte strukturelle Name, gefolgt von anderen Bezeichnungen, soweit bekannt; die CAS-Registrierungsnummer (CAS-Nr.), soweit bekannt;
- Reinheit und Zusammensetzung der Prüfchemikalien/Kontrollchemikalien (in Gewichtsprozent), soweit diesbezügliche Informationen vorliegen;
- physikalisch-chemische Eigenschaften wie physikalischer Zustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, Stabilität, Chemikalienklasse, Wasserlöslichkeit, soweit sie für die Studie relevant sind;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollchemikalien vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Stabilität, soweit bekannt.

Informationen zu Auftraggeber und Prüfanstalt

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters.

Testbedingungen

- verwendetes Opazimeter (z. B. Modell und Spezifikationen) und Geräteeinstellungen;
- Kalibrierungsdaten zu den für die Messung der Trübung und Durchlässigkeit verwendeten Geräten (z. B. Opazimeter und Spektrofotometer) zur Gewährleistung linearer Messungen;
- Typ des verwendeten Hornhalthalters (z. B. Modell und Spezifikationen);
- Beschreibung weiterer verwendeter Geräte;
- das zur Gewährleistung der Integrität (d. h. der Genauigkeit und Zuverlässigkeit) der Prüfmethode im Zeitverlauf angewandte Verfahren (z. B. regelmäßige Testung von Leistungschemikalien).

Testakzeptanzkriterien

- akzeptable gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen auf der Grundlage historischer Daten;

- gegebenenfalls akzeptable Reihen gleichzeitiger Referenzkontrollen auf der Grundlage historischer Daten.

Gewinnung und Vorbereitung der Augen

- Angaben zur Identifizierung der Bezugsquelle der Augen (d. h. Einrichtung, in der sie gewonnen wurden);
- Hornhautdurchmesser als Maß für das Alter des Herkunftstiers und seine Eignung für den Test;
- Lager- und Transportbedingungen der Augen (z. B. Datum und Uhrzeit der Gewinnung, Zeitspanne vor Testbeginn, Transportmedien und Temperaturbedingungen, eventuell verwendete Antibiotika);
- Vorbereitung und Einspannen der Rinderhornhäute, einschließlich Angaben zu ihrer Qualität, zur Temperatur der Hornhauthalter und zu den Kriterien für die Auswahl der bei den Tests verwendeten Hornhäute.

Testverfahren

- Anzahl der verwendeten Replikate;
- Identität der verwendeten Negativ- und Positivkontrollen (soweit zutreffend, auch der Lösungsmittel- und Referenzkontrollen);
- verwendete Prüfchemikalienkonzentration(en), Applikations- und Expositions- sowie Inkubationsdauer nach der Exposition;
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung der angewandten Studienakzeptanzkriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Testverfahren;
- Beschreibung der angewandten Entscheidungskriterien.

Ergebnisse

- tabellarische Aufstellung von Daten aus einzelnen Testproben (z. B. Trübungs- und OD₄₉₀-Werte und berechnete IVIS-Werte für die Prüfchemikalie und die Positiv-, Negativ- und Referenzkontrollen [soweit einbezogen], einschließlich Daten aus Wiederholungsversuchen, soweit durchgeführt, sowie Mittelwerte ± Standardabweichung für jeden Versuch);
- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- gegebenenfalls die abgeleitete In-vitro-Klassifizierung nach UN GHS.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerung

LITERATURHINWEISE

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter :
http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH-Veröffentlichung Nr. 10-7553: Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Verfügbar unter:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No. 189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York und Genf: United Nations. Verfügbar unter:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffman, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Hamernik, K., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., Mcnamee, P., Osborn, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba, K., Vassallo, M., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vinardell, P., Zuang, V (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter:
http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In*

Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-Veröffentlichung Nr. 10-7553A. Verfügbar unter: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.

- (8) INVITTOX (1999). Protokoll Nr. 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. und das Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), *Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*. Verfügbar unter: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. und Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.*, 36:106-117.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Angenommen am 25. Oktober 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
- (17) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.

- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH-Veröffentlichung Nr. 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Verfügbar unter:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997). Verfügbar unter:
http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Anlage 1

DEFINITIONEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Austauschbar mit „Reversible Wirkungen am Auge“ und mit der „UN-GHS-Kategorie 2“ (4).

Bottom-Up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zuerst Chemikalien, die keine Einstufung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Evidenzbasierte Bewertung: Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial einer Prüfchemikalie entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller positiven Chemikalien, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Sie ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller negativen Chemikalien, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Sie ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Gemisch oder Lösung aus zwei oder mehr Stoffen, die nicht miteinander reagieren (4).

Genauigkeit: Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode.

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahrenklassifizierung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf

Basis der vorliegenden Informationen zugeordnet werden kann, sind keine weiteren Testungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden kann.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (4).

Hornhaut: Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augennere übertragen wird.

Hornhautdurchlässigkeit: Quantitativer Messwert für die Schädigung der Epithelzellschicht der Hornhaut, ermittelt durch Bestimmung der Menge an Fluorescein-Natrium, die alle Zellschichten der Hornhaut durchdringt.

Hornhauttrübung: Messwert für die Undurchsichtigkeit der Hornhaut nach Applikation einer Prüfchemikalie. Eine verstärkte Hornhauttrübung ist ein Indikator für die Schädigung der Hornhaut. Die Trübung kann subjektiv (Draize-Kaninchenaugentest) oder objektiv (mithilfe eines Messgeräts, z. B. eines Opazimeters) bestimmt werden.

In-vitro-Reizwert (In Vitro Irritancy Score, IVIS): Eine bei der BCOP-Prüfmethode verwendete empirisch abgeleitete Formel, bei der der mittlere Trübungs- und der mittlere Durchlässigkeitswert für jede Behandlungsgruppe in einem einzigen In-Vitro-Wert zusammengefasst werden. $IVIS = \text{mittlerer Trübungs-} + (15 \times \text{mittlerer Durchlässigkeitswert})$.

Irreversible Wirkungen am Auge: Siehe „Schwere Augenschädigung“

Keine Einstufung nach UN-GHS: Chemikalien, die die Voraussetzungen für eine Einstufung in die UN-GHS-Kategorien 1 oder 2 (2A oder 2B) nicht erfüllen. Austauschbar mit „Nicht eingestuft“.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Komponenten eines Testsystems enthält, einschließlich des Lösungsmittels oder Vehikels, und die mit den prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden, zu bestimmen. Bei der Testung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Testsystem interagiert.

Negativkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält.

Diese Probe wird mit prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Testsystem interagiert.

Nicht eingestuft: Chemikalien, die nicht als augenreizend (UN-GHS-Kategorie 2, 2A oder 2B) oder schwer augenschädigend (UN-GHS-Kategorie 1) eingestuft sind. Austauschbar mit der UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“.

Opazimeter: Ein Instrument zur Messung der „Hornhauttrübung“ durch quantitative Evaluierung der Lichtübertragung durch die Hornhaut. Das Gerät besteht in der Regel aus zwei Kammern, beide mit eigener Lichtquelle und Fozelle. Eine Kammer wird für die behandelte Hornhaut verwendet, die zweite zur Kalibrierung und Nulleinstellung des Instruments. Licht aus einer Halogenleuchte wird durch eine Kontrollkammer (leere Kammer ohne Fenster oder Flüssigkeit) zu einer Fozelle geleitet und mit dem Lichtstrahl verglichen, der durch die Versuchskammer, welche die Kammer mit der Hornhaut enthält, zu einer Fozelle geleitet wird. Der Unterschied bei der Lichtübertragung aus den Fozellen wird errechnet und als numerischer Trübungswert digital angezeigt.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Referenzchemikalie: Eine zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendete Bezugsgröße. Eine Referenzchemikalie sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: i) beständige und zuverlässige Quelle(n); ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zur Klasse der geprüften Chemikalien; iii) bekannte physikalische/chemische Eigenschaften; iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und v) bekannte Potenz innerhalb der gewünschten Wirkungsspanne.

Reversible Wirkungen am Auge: Siehe „Augenreizung“.

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Austauschbar mit „Irreversible Wirkungen am Auge“ und mit der „UN-GHS-Kategorie 1“ (4).

Stoff: Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität notwendigen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können (4).

Tensid: Auch als oberflächenaktiver Stoff bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Stoffe, wie waschaktive Substanzen (Detergenzien), die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit

herabsetzen und so die Bildung von Schaum oder das Eindringen in feste Stoffe ermöglichen; auch bekannt als Netzmittel.

Tensidhaltiges Gemisch: Im Kontext dieser Prüfmethode ein Gemisch mit einem oder mehreren Tensiden in einer Endkonzentration von > 5 %.

Top-Down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zuerst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

UN-GHS-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung“

UN-GHS-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung“.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet.

Anlage 2

VORHERSAGEFÄHIGKEIT DER BCOP-PRÜFMETHODE

Tabelle 1: Vorhersagefähigkeit der BCOP-Prüfmethode für die Ermittlung von Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen ([UN-GHS/EU-CLP Kategorie 1 vs. nicht Kategorie 1 (Kategorie 2 + Keine Einstufung); US-EPA-Kategorie I vs. nicht Kategorie I (Kategorie II + Kategorie III + Kategorie IV)]

Klassifizierungssystem	Nr.	Genauigkeit		Empfindlichkeit		Falsche Negative		Spezifität		Falsche Positive	
		%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
UN-GHS EU-CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US-EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabelle 2: Vorhersagefähigkeit der BCOP-Prüfmethode für die Ermittlung von Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern („Stoffe ohne Reizwirkung“) [UN-GHS/EU-CLP Keine Einstufung vs. nicht Keine Einstufung (Kategorie 1 + Kategorie 2); US-EPA-Kategorie IV vs. nicht Kategorie IV (Kategorie I + Kategorie II + Kategorie III)]

Klassifizierungssystem	Nr.	Genauigkeit		Empfindlichkeit		Falsche Negative		Spezifität		Falsche Positive	
		%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
UN-GHS EU-CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US-EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Anlage 3

LEISTUNGSCHEMIKALIEN FÜR DIE BCOP-PRÜFMETHODE

Vor der routinemäßigen Anwendung dieser Prüfmethode sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz nachweisen, indem sie die 13 in Tabelle 1 empfohlenen Chemikalien in die richtige Augengefährdungsklasse einstufen. Die Chemikalien wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Augengefährdungen repräsentieren, die auf den Ergebnissen des In-vivo-Kaninchenaugentests (TG 405) (17) und dem UN-GHS-Klassifizierungssystem (d. h. den Kategorien 1, 2A, 2B oder „Nicht eingestuft“) basieren (4). Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Chemikalien im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und das Vorhandensein hochwertiger In-vitro-Daten aus der BCOP-Prüfmethode. Referenzdaten können aus dem *Streamlined Summary Document* (3) und den *Background Review Documents* des ICCVAM für die BCOP-Prüfmethode bezogen werden (2) (18).

Tabelle 1: Empfohlene Chemikalien für den Nachweis der technischen Kompetenz von Laboratorien zur Durchführung des BCOP-Tests

Chemikalie	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ¹	Physikalischer Zustand	In Vivo-Klassifizierung ²	BCOP-Klassifizierung
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumverbindung	flüssig	Kategorie 1	Kategorie 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, Amidin	fest	Kategorie 1	Kategorie 1
Dibenzoyl-D-Weinsäure	2743-38-6	Carbonsäure, Ester	fest	Kategorie 1	Kategorie 1
Imidazol	288-32-4	heterocyclisch	fest	Kategorie 1	Kategorie 1
Trichloressigsäure (30 %)	76-03-9	Carbonsäure	flüssig	Kategorie 1	Kategorie 1
2,6-Dichlorbenzoyl-chlorid	4659-45-4	Acyllhalogenid	flüssig	Kategorie 2A	Keine genaue/zuverlässige Vorhersage möglich
Ethyl-2-methylaceto-acetat	609-14-3	Ketone, Ester	flüssig	Kategorie 2B	Keine genaue/zuverlässige Vorhersage möglich
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Anorganisches Salz	fest	Kategorie 2 ³	Keine genaue/zuverlässige Vorhersage möglich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Di-Kaliumsalz	25102-12-9	Amin, Carbonsäure (Salz)	fest	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft

Tween 20	9005-64-5	Ester, Polyether	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft
2-Mercaptopyrimidin	1450-85-7	Acylhalogenid	fest	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft
Phenylbutazon	50-33-9	heterocyclisch	fest	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft
Polyoxyethylen-23-laurylether (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

¹ Jede Prüfchemikalie wurde anhand einer Standard-Klassifizierungsregelung auf Basis des Klassifizierungssystems der National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) einer Chemikalienklasse zugeordnet (verfügbar unter <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

² Gestützt auf Ergebnisse aus dem In-vivo-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) (17) unter Verwendung des UN-GHS (4).

³ Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die In-vivo-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Bindehautrötung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Das eine Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wies (an Tag 7) einen Bindehautrötungswert von 1 auf, der an Tag 10 ganz zurückging.

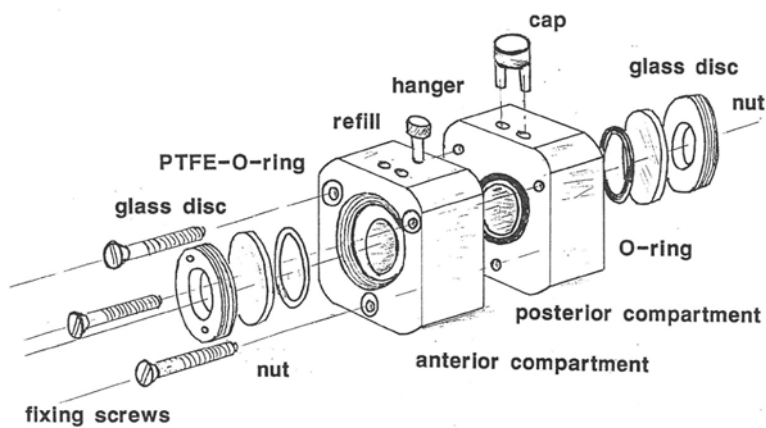
Anlage 4

BCOP-HORNHAUTHALTER

BCOP-Hornhauthalter sind aus einem trägen Material (z. B. Polypropylen) gefertigt. Sie bestehen aus zwei Hälften (einer Vorder- und einer Hinterkammer) sowie zwei identischen zylindrischen Innenkammern. Jede Kammer hat ein Fassungsvermögen von ca. 5 ml und schließt mit einer Glasscheibe ab, durch die die Trübungsmesswerte abgelesen werden. Jede Innenkammer hat einen Durchmesser von 1,7 cm und ist 2,2 cm tief¹. Ein auf der Hinterkammer positionierter Dichtungsring verhindert Leckagen. Die Hornhäute werden mit der Endothel-Seite nach unten auf den Dichtungsring der Hinterkammern platziert, während die Vorderkammern auf die Epithel-Seite der Hornhäute gesetzt werden. Die Kammern werden mit drei Schrauben aus rostfreiem Stahl an den Außenkanten der Kammer fixiert. Jede Kammer schließt mit einer Glasscheibe ab, die für den leichten Zugang zur Hornhaut abgenommen werden kann. Um Leckagen zu verhindern, befindet sich zwischen Glasscheibe und Kammer ein weiterer Dichtungsring. Zwei Öffnungen auf der Oberseite jeder Kammer gestatten den Ein- und Auslass des Mediums und der Prüfchemikalien. Sie werden während der Behandlung und der Inkubation mit Gummistöpseln verschlossen. Die Lichtübertragung durch die Hornhauthalter kann sich potenziell verändern, da Lichtstreuung oder Reflexion durch Abnutzung oder Ablagerung bestimmter chemischer Rückstände an den Bohrungen der Innenkammer oder an der Glasscheibe beeinflusst werden können. Dies könnte höhere oder niedrigere Referenzwerte für die Lichtübertragung durch die Hornhauthalter (und umgekehrt niedrigere oder höhere Referenztrübungswerte) zur Folge haben und sich als deutliche Veränderungen bei den erwarteten ersten Referenzmessungen der Hornhauttrübung in den einzelnen Kammern bemerkbar machen (d. h. die anfänglichen Hornhauttrübungswerte bei spezifischen einzelnen Hornhauthaltern können regelmäßig um mehr als zwei oder drei Trübungseinheiten von den erwarteten Referenzwerten abweichen). Jedes Labor sollte in Erwägung ziehen, ein Programm zur Evaluierung der Veränderungen der Lichtübertragung durch die Hornhauthalter einzurichten, das die Art der geprüften Chemikalien und die Häufigkeit des Gebrauchs der Kammern berücksichtigt. Zur Festlegung von Referenzwerten können die Hornhauthalter vor dem regelmäßigen Einsatz durch Messung der Referenztrübungswerte (oder Lichtübertragung) der vollständig mit dem Medium gefüllten

¹ Es handelt sich um Abmessungen einer Halterung für Hornhäute von Kühen im Alter von 12 bis 60 Monaten. Soweit Tiere im Alter von sechs bis 12 Monaten verwendet werden, müsste die Halterung so konzipiert sein, dass jede Kammer 4 ml fasst und jede Innenkammer einen Durchmesser von 1,5 cm aufweist und 2,2 cm tief ist. Bei jedem neuen Halterungsmodell ist ausschlaggebend, dass das Verhältnis zwischen der exponierten Hornhautoberfläche und dem Fassungsvermögen der Hinterkammer dem jeweiligen Verhältniswert bei herkömmlichen Hornhauthaltern entspricht. Dadurch wird sichergestellt, dass die Durchlässigkeitswerte zwecks Berechnung des IVIS-Wertes nach der vorgeschlagenen Formel korrekt bestimmt werden.

Kammern, ohne Hornhäute, geprüft werden. Anschließend werden die Hornhauthalter während ihres Einsatzes in regelmäßigen Abständen auf Veränderungen der Lichtübertragung kontrolliert. Jedes Labor kann die Häufigkeit der Kontrollen der Hornhauthalter abhängig von der Art der geprüften Chemikalien, der Häufigkeit des Gebrauchs und der beobachteten Veränderungen der Referenzwerte für die Hornhauttrübung festlegen. Werden deutliche Veränderungen in der Lichtübertragung durch die Hornhauthalter festgestellt, sind eine Reinigung und/oder Polierung der Innenfläche der Hornhauthalter mit geeigneten Verfahren oder ein Austausch in Betracht zu ziehen.



Hornhauthalter: Explosionsdarstellung

Anlage 5

OPAZIMETER

51. Der Opazimeter ist ein Gerät zur Messung der Lichtübertragung. Bei dem zur Validierung des BCOP-Tests verwendeten Gerät OP-KIT von Electro Design (Riom, Frankreich) wird beispielsweise Licht aus einer Halogenleuchte durch eine Kontrollkammer (leere Kammer ohne Fenster oder Flüssigkeit) zu einer Fozelle geleitet und mit dem Lichtstrahl verglichen, der durch die Versuchskammer, welche die Kammer mit der Hornhaut enthält, zu einer Fozelle geleitet wird. Der Unterschied bei der Lichtübertragung aus den Fozellen wird errechnet und als numerischer Trübungswert digital angezeigt. Die Trübungseinheiten sind vorgegeben. Andere Arten von Opazimetern mit einem anderen Aufbau (bei denen z. B. keine parallelen Messungen der Kontrollkammer und Versuchskammer erforderlich sind) können verwendet werden, wenn sie nachweislich ähnliche Ergebnisse wie das validierte Gerät liefern.
52. Der Opazimeter sollte eine lineare Reaktion innerhalb eines Bereichs von Trübungsmesswerten ergeben, der den Schwellenwerten für die vom Vorhersagemodell beschriebenen unterschiedlichen Klassifizierungen (d. h. bis zu dem Schwellenwert, der die verätzende/stark reizende Wirkung bestimmt) Rechnung trägt. Um lineare und akkurate Messwerte bis zu 75-80 Trübungseinheiten zu gewährleisten, muss der Opazimeter mit einer Reihe von Kalibratoren geeicht werden. Die Kalibratoren werden in die Kalibrierkammer (eine für die Aufnahme der Kalibratoren konzipierte Hornhautkammer) platziert und auf dem Opazimeter abgelesen. Die Kalibrierkammer ist derart konzipiert, dass die Kalibratoren in ungefähr demselben Abstand zu Lichtquelle und Fozelle gehalten werden, in dem sich die Hornhäute bei der Trübungsmessung befinden würden. Die Referenzwerte und der anfängliche Sollwert sind von der Art des verwendeten Geräts abhängig. Die Linearität der Trübungsmessungen sollte durch geeignete (instrumentspezifische) Verfahren sichergestellt werden. Beim Gerät OP-KIT von Electro Design (Riom, Frankreich) wird der Opazimeter beispielsweise zunächst auf null Trübungseinheiten geeicht, wobei die Kalibrierkammer ohne Kalibrator verwendet wird. Anschließend werden nacheinander drei unterschiedliche Kalibratoren in die Kalibrierkammer gesetzt, und die Trübungswerte werden gelesen. Die Kalibratoren 1, 2 und 3 sollten Trübungswerte ergeben, die ihren eingestellten Werten von 75, 150 bzw. 225 Trübungseinheiten $\pm 5\%$ entsprechen.“

(13) In Teil B erhält Kapitel B.48 folgende Fassung:

„B.48 Test am isolierten Hühnerauge zur Identifizierung von i) Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen, und ii) Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 438 (2013). Der Test am isolierten Hühnerauge (*Isolated Chicken Eye*, ICE) wurde vom Organisationsübergreifenden Koordinationsausschuss zur Validierung alternativer Methoden (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) unter Mitwirkung des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) und des Japanischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) in den Jahren 2006 und 2010 evaluiert (1) (2) (3). Bei der ersten Evaluierung wurde der ICE-Test als wissenschaftlich fundierte Prüfmethode für den Einsatz als Screening-Test zur Identifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die schwere Augenschäden (Kategorie 1) gemäß Definition im Globalen Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN) (1) (2) (4) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen¹ verursachen, anerkannt. Bei der zweiten Evaluierung wurde der ICE-Test im Hinblick auf seine Eignung als Screening-Test zur Identifizierung von Chemikalien, die nicht als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß UN-GHS einzustufen sind, beurteilt (3) (4). Die Ergebnisse der Validierungsstudie und die Empfehlungen der Peer-Review-Gruppe bestätigten die ursprüngliche Empfehlung, den ICE-Test für die Einstufung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-Kategorie 1) zu verwenden, da sich die verfügbare Datenbank seit der ursprünglichen Validierung des ICCVAM nicht geändert hat. In jener Phase wurden keine weiteren Empfehlungen für eine Erweiterung des Anwendungsbereichs des ICE-Tests auch auf andere Kategorien ausgesprochen. Es wurde

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

eine Neubewertung des in der Validierungsstudie verwendeten In-Vitro- und In-vivo-Datensatzes durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Evaluierung der Zweckmäßigkeit des ICE-Tests für die Identifizierung von Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (5) erfordern. Die Neubewertung führte zu dem Ergebnis, dass der ICE-Test auch verwendet werden kann, um Chemikalien zu identifizieren, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß UN-GHS (4) (5) erfordern. Diese Prüfmethode berücksichtigt die empfohlenen Einsatzbereiche und Einsatzgrenzen des ICE-Tests auf Grundlage dieser Evaluierungen. Die Hauptunterschiede zwischen der ursprünglichen Fassung der OECD-Prüflinie aus dem Jahr 2009 und der aktualisierten Fassung von 2013 sind u. a. die Verwendung des ICE-Tests zur Identifizierung von Chemikalien, die keine Einstufung nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem erfordern, eine Aktualisierung der Elemente des Prüfberichts, eine Aktualisierung der Definitionen in Anlage 1 sowie eine Aktualisierung der Leistungsschemikalien in Anlage 2.

2. Gegenwärtig herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der In-vivo-Draize-Augentest in absehbarer Zukunft nicht durch einen einzigen In-vitro-Augenreizungstest ersetzt werden kann, der in der Lage ist, das gesamte Spektrum an Augenreizungen für verschiedene Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen ist es jedoch möglich, den Draize-Augentest durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen einer (gestuften) Prüfstrategie zu ersetzen (6). Der Top-Down-Ansatz (7) wird verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie ein hohes Reizpotenzial aufweist. Umgekehrt wird der Bottom-Up-Ansatz (7) verwendet, wenn auf Basis der vorliegenden Informationen davon auszugehen ist, dass eine Chemikalie keine ausreichende Augenreizung für eine Einstufung hervorruft. Der ICE-Test ist eine In-vitro-Prüfmethode, die unter bestimmten Bedingungen und mit bestimmten Grenzen, wie unter den Nummern 8 bis 10 erläutert, zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien mit augengefährdender Wirkung angewendet werden kann. Auch wenn der Test den In-vivo-Kaninchentest nicht absolut ersetzen kann, wird der ICE-Test als erster Schritt im Rahmen einer Prüfstrategie wie des von Scott *et al.* vorgeschlagenen Top-Down-Ansatzes (7) empfohlen, um ohne weitere Tests (4) schwer augenschädigende Chemikalien, d. h. Chemikalien, die in die UN-GHS-Kategorie 1 einzustufen sind, zu identifizieren. Der ICE-Test wird auch für die Identifizierung von Chemikalien empfohlen, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß UN-GHS (Keine Einstufung (*No Category*), NC) (4) erfordern, und kann daher als erster Schritt im Rahmen einer Prüfstrategie mit Bottom-up-Ansatz verwendet werden (7). Im Falle einer Chemikalie, bei der mit dem ICE-Test nicht vorhergesagt werden kann, dass sie schwere Augenschäden verursacht oder keine Einstufung als augenreizend/schwer augenschädigend erfordert, müssten jedoch weitere Tests (in vitro und/oder in vivo) durchgeführt werden, um eine eindeutige Einstufung festzulegen. Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden,

bevor der ICE-Test in einem Bottom-Up-Ansatz unter einer anderen Klassifizierungsregelung als dem UN-GHS angewendet wird.

3. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte für die Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie, gemessen als ihre Fähigkeit, im isolierten Hühnerauge eine toxische Wirkung hervorzurufen oder nicht. Toxische Wirkungen auf die Hornhaut werden gemessen durch i) qualitative Bewertung der Trübung, ii) qualitative Bewertung der Schädigung der Epithel-Zellschicht durch Applikation von Fluorescein auf das Auge (Fluorescein-Verfärbung), iii) quantitative Messung verstärkter Dicke (Schwellung) und iv) qualitative Beurteilung makroskopischer morphologischer Oberflächenschädigungen. Hornhauttrübungen, Hornhautschwellungen und Hornhautschädigungen nach Applikation einer Prüfchemikalie werden zunächst einzeln bewertet und anschließend zwecks Klassifizierung des Augenreizwertes (*Eye Irritancy Classification*) kombiniert.
4. Definitionen sind Anlage 1 zu entnehmen.

VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

5. Diese Prüfmethode basiert auf dem im *OECD Guidance Document 160* (8) empfohlenen Protokoll, das im Anschluss an eine internationale Validierungsstudie des ICCVAM (1) (3) (9) und unter Mitwirkung des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*), des Japanischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) und der Abteilung Toxikologie und angewandte Pharmakologie des niederländischen Forschungsinstituts TNO *Quality of Life* entwickelt wurde. Das Protokoll beruht auf Informationen aus veröffentlichten Protokollen und auf dem von TNO derzeit verwendeten Protokoll (10) (11) (12) (13) (14).
6. Bei der dieser Prüfmethode zugrunde liegenden Validierung wurde ein breites Spektrum von Chemikalien getestet. Die empirische Datenbank der Validierungsstudie umfasste 152 Chemikalien (72 Stoffe und 80 Gemische) (5). Die Prüfmethode ist auf Feststoffe, Flüssigkeiten, Emulsionen und Gele anwendbar. Die Flüssigkeiten können wässrig oder nichtwässrig, die Feststoffe wasserlöslich oder wasserunlöslich sein. Gase und Aerosole wurden in einer Validierungsstudie bisher noch nicht bewertet.
7. Der ICE-Test kann zur Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien, d. h. Chemikalien, die in die UN-GHS-Kategorie 1 (4) einzustufen sind, angewendet werden. In diesem Anwendungsbereich beruhen die anerkannten Einsatzgrenzen des ICE-Tests auf den hohen Falsch-Positiv-Raten für Alkohole und den hohen Falsch-Negativ-Raten für Feststoffe und Tenside (1) (3) (9). Die Falsch-Negativ-Raten sind in diesem Kontext (UN-GHS-Kategorie 1 wird als nicht UN-GHS-Kategorie 1 erkannt) jedoch nicht maßgeblich, da alle Prüfchemikalien mit negativem Ergebnis anschließend im Rahmen anderer angemessen validierter In-vitro-Tests oder als letzte Möglichkeit – je nach Vorschriften –

an Kaninchen anhand einer sequenziellen Prüfstrategie mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz (*weight-of-evidence approach*) geprüft werden. Es ist zu beachten, dass Feststoffe beim In-vivo-Draize-Augenreizungstest zu variablen und extremen Expositionsbedingungen führen können, aus denen sich möglicherweise irrelevante Vorhersagen über das tatsächliche Reizungspotenzial ableiten (15). Prüfer können diese Prüfmethode jedoch für alle Arten von Chemikalien einsetzen und ein Positivergebnis als Indikator für eine schwer augenschädigende Wirkung, d. h. eine Einstufung in UN-GHS-Kategorie 1, ohne weitere Tests akzeptieren. Positivergebnisse bei Verwendung von Alkohol sollten angesichts des Risikos von Falsch-Positiv-Prognosen (*over-prediction*) jedoch mit einer gewissen Zurückhaltung interpretiert werden.

8. Gemessen an Daten aus In-vivo-Kaninchenaugentests, die nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem eingestuft wurden, weist der ICE-Test hinsichtlich der Identifizierung von Chemikalien mit schwer augenschädigender Wirkung (UN-GHS-Kategorie 1) eine allgemeine Genauigkeit von 86 % (120/140), eine Falsch-Positiv-Rate von 6 % (7/113) und eine Falsch-Negativ-Rate von 48 % (13/27) auf (4) (5).
9. Der ICE-Test kann auch zur Identifizierung von Chemikalien angewendet werden, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend gemäß dem UN-GHS-Klassifizierungssystem erfordern (4). Bevor der ICE-Test in einem Bottom-Up-Ansatz unter einer anderen Klassifizierungsregelung angewendet wird, sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden. Diese Prüfmethode kann für alle Arten von Chemikalien eingesetzt werden, wobei ein Negativergebnis als Indikator für die Nichteinstufung einer Chemikalie als augenreizend oder schwer augenschädigend akzeptiert werden könnte. Auf der Basis eines Ergebnisses aus der Validierungsdatenbank besteht bei Bewuchsschutzfarben mit organischen Lösungsmitteln jedoch das Risiko von Falsch-Negativ-Prognosen (*under-prediction*) (5).
10. Gemessen an Daten aus In-vivo-Kaninchenaugentests, die nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem eingestuft wurden, weist der ICE-Test hinsichtlich der Identifizierung von Chemikalien, die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern, eine allgemeine Genauigkeit von 82 % (125/152), eine Falsch-Positiv-Rate von 33 % (26/79) und eine Falsch-Negativ-Rate von 1 % (1/73) auf (4) (5). Werden Stoffe einer bestimmten Chemikalienklasse (d. h. Bewuchsschutzfarben mit organischen Lösungsmitteln) aus der Datenbank ausgeschlossen, so liegt die Genauigkeit des ICE-Tests gemessen am UN-GHS-Klassifizierungssystem bei 83 % (123/149), die Falsch-Positiv-Rate bei 33 % (26/78) und die Falsch-Negativ-Rate bei 0 % (0/71) (4) (5).
11. Aufgrund der beträchtlichen Anzahl von Chemikalien der UN-GHS-Kategorie 1, die zu niedrig in die UN-GHS-Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft sind, und von Chemikalien, die keine Einstufung erfordern, jedoch zu hoch in die UN-GHS-Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft sind, wird der ICE-Test nicht für die Identifizierung von Prüfchemikalien empfohlen, die als augenreizend (d. h. UN-GHS-Kategorie 2 oder Kategorie 2A) oder

leicht augenreizend (UN-GHS-Kategorie 2B) eingestuft werden sollten. Diesbezüglich können weitere Tests mit einer anderen geeigneten Methode erforderlich sein.

12. Bei allen Verfahren, die Hühneraugen involvieren, sind die geltenden Regeln und Verfahrensvorschriften der Prüfanstalt für den Umgang mit Human- bzw. Tiermaterial (u. a. Gewebe und Gewebeflüssigkeiten) einzuhalten. Universelle Laborregeln sollten beachtet werden (16).
13. Die im Kaninchenaugentest evaluierten Bindehaut- und Irisverletzungen werden beim ICE-Test zwar außer Acht gelassen, doch werden bei der Prüfmethode Auswirkungen auf die Hornhaut berücksichtigt, die wesentliche Einflussfaktoren für die In-vivo-Klassifizierung nach dem UN-GHS-Klassifizierungssystem bilden. Auch wurde – obwohl sich die Reversibilität von Hornhautläsionen per se mit dem ICE-Test nicht beurteilen lässt – ausgehend von Kaninchenaugenstudien vorgeschlagen, dass eine Bewertung der anfänglichen Tiefe der Hornhautverletzung herangezogen werden kann, um einige Arten irreversibler Wirkungen zu identifizieren (17). Insbesondere sind weitere wissenschaftliche Erkenntnisse erforderlich, um zu verstehen, wie irreversible Wirkungen auftreten, die nicht mit einer anfänglichen starken Verletzung im Zusammenhang stehen. Schließlich sei auch erwähnt, dass das Potenzial für eine mit der Augenexposition verbundene systemische Toxizität mit der ICE-Methode nicht bewertet werden kann.
14. Diese Prüfmethode wird regelmäßig aktualisiert, um neue Informationen und Daten zu berücksichtigen. Beispielsweise können histopathologische Befunde potenziell nützlich sein, wenn eine umfassendere Charakterisierung der Hornhautschädigung erforderlich ist. Zur Evaluierung dieser Möglichkeit sollten Anwender die Augen aufbewahren und histopathologische Proben zubereiten, die zum Aufbau einer Datenbank und zur Entwicklung von Entscheidungskriterien herangezogen werden können, mit denen sich die Genauigkeit dieser Prüfmethode weiter verbessern lässt. Die OECD hat einen Leitfaden (*Guidance Document*) für die Anwendung von Prüfmethode zur Untersuchung der okularen Toxizität erarbeitet. Dieser enthält ausführliche Verfahrensanweisungen für die Entnahme histopathologischer Proben und Angaben darüber, wo die Proben und/oder histopathologischen Daten einzureichen sind (8).
15. Laboratorien, die diese Prüfmethode erstmals anwenden, sollten die in Anlage 2 genannten Leistungschemikalien verwenden. Laboratorien können diese Chemikalien verwenden, um ihre technische Kompetenz zur Durchführung des ICE-Tests nachzuweisen, bevor sie ICE-Testdaten zum Zwecke der vorschriftsmäßigen Gefahrenklassifizierung einreichen.

TESTPRINZIP

16. Die ICE-Prüfmethode ist ein organotypisches Modell, das die Zellstruktur des Hühnerauges *in vitro* kurzfristig funktionsfähig hält. Bei dieser Prüfmethode werden durch die Prüfchemikalie hervorgerufene Schäden als Hornhautschwellungen, Hornhauttrübung und

korneale Fluorescein-Verfärbung festgestellt. Während die beiden letztgenannten Parameter eine qualitative Bewertung erfordern, muss die Hornhautschwellung quantitativ bestimmt werden. Jedes Messergebnis wird entweder in einen quantitativen Wert umgerechnet, der seinerseits für die Berechnung eines Gesamtreizindexes (*Overall Irritancy Index*) zugrunde gelegt wird, oder einer Qualitätskategorie zugeordnet, die wiederum für die Einordnung in Klassen für Chemikalien mit in vitro augengefährdender Wirkung (UN-GHS-Kategorie 1 oder keine Einstufung nach UN-GHS) herangezogen wird. Jedes dieser Ergebnisse kann dann verwendet werden, um das Potenzial einer Prüfchemikalie, in vivo schwere Augenschäden hervorzurufen oder keine Einstufung als augengefährdend zu erfordern, vorherzusagen (siehe Entscheidungskriterien). Allerdings ist keine Einstufung bei Chemikalien möglich, bei denen mit dem ICE-Test nicht vorhergesagt wird, dass sie schwere Augenschäden verursachen oder nicht einzustufen sind (siehe Nummer 11).

Bezugsquelle und Alter der Hühneraugen

17. Traditionell werden für diesen Test Augen von Hühnern verwendet, die in einer Schlächtereier für den menschlichen Verzehr geschlachtet wurden; auf diese Weise wird der Einsatz von Versuchstieren vermieden. Nur Augen von gesunden Tieren, die als für die Nahrungskette geeignet angesehen werden, dürfen verwendet werden.
18. Es wurde keine kontrollierte Studie zur Bestimmung des optimalen Alters der Hühner durchgeführt, doch werden für diesen Test bisher Hühner verwendet, bei denen es sich nach Alter und Gewicht um Junghühner handelt (d. h. Hühner im Alter von ungefähr sieben Wochen mit einem Gewicht von 1,5 bis 2,5 kg), die in der Regel in einer Geflügelschlächtereier geschlachtet werden.

Gewinnung und Beförderung der Augen zum Labor

19. Die Köpfe sollten unmittelbar nach dem Betäuben der Tiere, normalerweise durch Elektroschock, und nach dem Entbluten durch Nackenstich abgesetzt werden. Sie sollten aus einer in Nähe des Labors gelegenen Quelle bezogen werden, um die Köpfe möglichst schnell vom Schlachthof zum Labor befördern zu können, damit sich ihr Zustand nicht verschlechtert und/oder Bakterienkontaminationen auf ein Mindestmaß begrenzt werden. Der Zeitabstand zwischen der Gewinnung der Hühnerköpfe und ihrem Einsetzen in die Superfusionskammer nach der Ausschälung muss möglichst gering sein (d. h. höchstens zwei Stunden betragen), damit die Akzeptanzkriterien des Tests erfüllt werden. Alle für die Prüfung verwendeten Augen sollten aus einer an ein und demselben Tag gewonnenen Partie Augen stammen.
20. Da die Augen im Labor seziiert werden, sind die intakten Köpfe in Kunststoffbehältnissen, die mit Tüchern, welche in isotonischer Kochsalzlösung getränkt wurden, ausgeschlagen

sind, und bei Umgebungstemperatur (normalerweise zwischen 18 °C und 25 °C) vom Schlachthof zum Labor zu befördern.

Auswahlkriterien und Anzahl der Augen, die im ICE-Test eingesetzt werden

21. Augen mit starker Ausgangs-Fluorescein-Verfärbung (d. h. $> 0,5$) oder mit starker Hornhauttrübung (d. h. $> 0,5$) nach der Ausschälung werden verworfen.
22. Jede Behandlungsgruppe und die gleichzeitige Positivkontrolle umfassen mindestens drei Augen. Die Negativkontrollen bzw. die Lösungsmittelkontrolle (wenn ein anderes Lösungsmittel als Kochsalzlösung verwendet wird) bestehen aus mindestens einem Auge.
23. Im Fall von Feststoffen mit dem GHS-Ergebnis „Keine Einstufung“ (*No Category*, NC) wird ein zweiter Durchlauf mit drei Augen empfohlen, um das Negativergebnis zu bestätigen oder zu verwerfen.

VERFAHREN

Vorbereitung der Augen

24. Die Augenlider werden sorgfältig weggeschnitten, wobei darauf zu achten ist, dass die Hornhaut nicht beschädigt wird. Die Unversehrtheit der Hornhaut wird mithilfe eines Tropfens von 2 %igem (w/v) Natrium-Fluorescein, der für einige Sekunden auf die Hornhautoberfläche appliziert und anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült wird, schnell überprüft. Fluorescein-behandelte Augen werden sodann mit einem Spaltlampenmikroskop auf Hornhautschädigung untersucht (d. h. Fluorescein-Verfärbung und Hornhauttrübungswerte müssen $\leq 0,5$ betragen).
25. Liegt keine Schädigung vor, wird das Auge weiter freigelegt, wobei dafür Sorge zu tragen ist, dass die Hornhaut nicht beschädigt wird. Der Augapfel wird aus der Augenhöhle herausgezogen, indem die Nickhaut mithilfe einer chirurgischen Zange festgehalten und die Augenmuskulatur mit einer gebogenen, stumpfendigen Schere durchtrennt wird. Dieser Schritt ist wichtig, um zu vermeiden, dass die Hornhaut durch übermäßigen Druck geschädigt wird (Kompressionsartefakte).
26. Beim Herauslösen des Auges aus der Augenhöhle sollte ein sichtbarer Teil des Sehnervs noch anhaften. Das Auge wird anschließend auf eine saugfähige Unterlage gesetzt, und Nickhaut sowie anderes Bindegewebe werden weggeschnitten.
27. Das auf diese Weise ausgeschälte Auge wird in einer Klemme aus rostfreiem Stahl fixiert, wobei die Hornhaut vertikal positioniert sein muss. Die Klemme wird sodann in eine Kammer des Superfusionsgeräts gesetzt (18). Im Superfusionsgerät sind die Klemmen so zu positionieren, dass die gesamte Hornhaut mit der Kochsalzinfusion (3-4 Tropfen pro Minute bzw. 0,1-0,15 ml/min) versorgt wird. Die Temperatur in den Kammern des Superfusionsgeräts sollte auf $32 \pm 1,5^\circ\text{C}$ gehalten werden. Anlage 3 zeigt ein Schaubild eines typischen Superfusionsgeräts mit Augenklemmen; das Gerät ist im Handel fertig

oder als Bausatz erhältlich. Es kann den Bedürfnissen des jeweiligen Labors angepasst werden (z. B. um Augen in verschiedener Anzahl aufzunehmen).

28. Nach dem Einsetzen ins Superfusionsgerät werden die Augen erneut mit einem Spaltlampenmikroskop untersucht, um sicherzustellen, dass sie während des Sezierens nicht beschädigt wurden. Bei dieser Gelegenheit sollte mit dem Pachometeraufsatz des Spaltlampenmikroskops auch die Hornhautdicke im Apex gemessen werden. Augen mit i) einer Fluorescein-Verfärbung von $> 0,5$, ii) einer Hornhauttrübung von $> 0,5$ oder iii) etwaigen anderen Anzeichen einer Schädigung sind zu ersetzen. Einzelne Augen, auf die keines der genannten Kriterien zutrifft, werden verworfen, wenn sie eine Hornhautdicke aufweisen, die mehr als 10 % vom mittleren Dickenwert aller Augen zusammengerechnet abweicht. Anwender sollten sich darüber im Klaren sein, dass Spaltlampenmikroskope mit unterschiedlicher Spaltbreiteneinstellung unterschiedliche Dickenmesswerte ergeben können. Die Spaltbreite sollte auf 0,095 mm eingestellt sein.
29. Sobald alle Augen untersucht und für einwandfrei befunden wurden, werden sie zwecks Äquilibration des Testsystems vor Applikation der Prüfchemikalie für ungefähr 45 bis 60 Minuten inkubiert. Nach der Äquilibration werden Referenzmessungen von Hornhautdicke und Hornhauttrübung zum Zeitpunkt Null vorgenommen, welche als Referenzszenario dienen (d. h. Zeitpunkt = 0). Der beim Sezieren ermittelte Fluorescein-Wert wird als Referenzmesswert für diesen Endpunkt verwendet.

Applikation der Prüfchemikalie

30. Unmittelbar nach den Referenzmessungen zum Null-Zeitpunkt wird das Auge (in seiner Halterung) aus dem Superfusionsgerät entnommen und zur Applikation der Prüfchemikalie auf die Hornhaut horizontal positioniert.
31. Flüssige Prüfchemikalien werden in der Regel unverdünnt getestet, können jedoch verdünnt werden, sofern dies für notwendig gehalten wird (z. B. als Teil des Studienkonzepts). Bevorzugtes Lösungsmittel für verdünnte Prüfchemikalien ist physiologische Kochsalzlösung. Unter kontrollierten Bedingungen können auch alternative Lösungsmittel verwendet werden, deren Eignung jedoch nachzuweisen ist.
32. Flüssige Prüfchemikalien werden so auf die Hornhaut appliziert, dass die gesamte Hornhautoberfläche gleichmäßig von der Prüfchemikalie bedeckt ist; das Standardvolumen beträgt 0,03 ml.
33. Feste Prüfchemikalien sollten wenn möglich im Mörser oder mit einem vergleichbaren Zerkleinerungsgerät so fein wie möglich gemahlen werden. Das Pulver wird so auf die Hornhaut appliziert, dass die Oberfläche von der Prüfchemikalie gleichmäßig bedeckt ist; die Standardmenge beträgt 0,03 g.
34. Die Prüfchemikalie (flüssig oder fest) wird für 10 Sekunden appliziert und anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung (ungefähr 20 ml) bei Umgebungstemperatur vom Auge

abgespült. Das Auge (in seiner Halterung) wird anschließend wieder in aufrechter Ausgangsstellung in das Superfusionsgerät eingesetzt. Bei Bedarf können nach der 10-sekündlichen Applikation und zu späteren Zeitpunkten (z. B. bei der Feststellung von Rückständen der Prüfchemikalie auf der Hornhaut) weitere Spülungen vorgenommen werden. Im Allgemeinen ist die Menge an Kochsalzlösung, die zusätzlich für die Spülungen verwendet wird, nicht maßgeblich; wichtig ist jedoch die Beobachtung von Anhaftungen der Chemikalie an der Hornhaut.

Kontrollchemikalien

35. Jeder Versuch sollte gleichzeitige Negativ- oder Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen und gleichzeitige Positivkontrollen umfassen.
36. Beim Prüfen unverdünnter (100 %iger) Flüssigkeiten oder Feststoffe wird als gleichzeitige Negativkontrolle im ICE-Test physiologische Kochsalzlösung verwendet, um unspezifische Veränderungen im Testsystem festzustellen und um sicherzustellen, dass die Testbedingungen keine ungerechtfertigten Reizwirkungen hervorrufen.
37. Zum Testen verdünnter Flüssigkeiten umfasst der Test auch eine Gruppe gleichzeitiger Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen, um unspezifische Veränderungen im Testsystem nachzuweisen und um sicherzustellen, dass die Testbedingungen keine ungerechtfertigten Reizwirkungen hervorrufen. Wie unter Nummer 31 erwähnt, sind nur Lösungsmittel/Vehikel zulässig, die das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigen.
38. Jeder Versuch umfasst als gleichzeitige Positivkontrolle einen bekannten Augenreizstoff, damit überprüft werden kann, ob eine adäquate Wirkung eintritt. Da der ICE-Test bei dieser Prüfmethode eingesetzt wird, um verätzende oder stark reizende Stoffe zu identifizieren, sollte es sich bei der Positivkontrolle um eine Referenzchemikalie handeln, die bei dieser Prüfmethode eine starke Wirkung hervorruft. Um zu gewährleisten, dass die Veränderlichkeit der Reaktion der Positivkontrolle im Zeitverlauf bewertet werden kann, sollte die Reaktionsstärke jedoch nicht allzu heftig sein. Es sollten genügend In-vitro-Daten für die Positivkontrolle generiert werden, damit eine statistisch vorgegebene vertretbare Spanne für die Positivkontrolle berechnet werden kann. Liegen für eine bestimmte Positivkontrolle keine angemessenen historischen Daten zur ICE-Prüfmethode vor, so können Studien erforderlich werden, um die notwendigen Daten zu generieren.
39. Beispiele für Positivkontrollen für flüssige Prüfchemikalien sind 10 %ige Essigsäure oder 5 %iges Benzalkoniumchlorid, während für Positivkontrollen für feste Prüfchemikalien Natriumhydroxid oder Imidazol in Frage kommen.
40. Referenzchemikalien sind nützlich für die Evaluierung des Augenreizpotenzials unbekannter Chemikalien einer bestimmten Chemikalien- oder Produktklasse oder zur Evaluierung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

Gemessene Endpunkte

41. Behandelte Hornhäute werden vor der Behandlung evaluiert sowie in Abständen von 30, 75, 120, 180 und 240 Minuten (± 5 Minuten) nach dem Abspülen im Anschluss an die Behandlung. Diese Zeitreihe gestattet eine angemessene Anzahl von Messungen während des vierstündigen Behandlungszeitraums und lässt genügend Zeit zwischen den Messungen, um alle Augen vorschriftsgemäß beobachten zu können.
42. Die evaluierten Endpunkte sind Hornhauttrübung, Hornhautschwellung, Fluorescein-Verfärbung und morphologische Effekte (z. B. durchlöchertes oder abgelöstes Epithel). Alle Endpunkte mit Ausnahme der Fluorescein-Verfärbung (die ausschließlich vor der Behandlung sowie 30 Minuten nach Applikation der Prüfchemikalie ermittelt wird) werden zu jedem der vorgenannten Zeitpunkte bestimmt.
43. Hornhauttrübung, Fluorescein-Verfärbung, morphologische Effekte und, sofern sie vorliegen, histopathologische Befunde sollten fotografiert werden.
44. Nach der abschließenden Untersuchung am Ende des vierstündigen Behandlungszeitraums sind die Augen in einer geeigneten Fixierlösung (z. B. neutrales gepuffertes Formalin) aufzubewahren, damit sie gegebenenfalls histopathologisch untersucht werden können (Einzelheiten siehe Nummer 14 und Literaturhinweis (8)).
45. Hornhautschwellungen werden durch Hornhautdickenmessungen bestimmt, die mit dem optischen Pachometeraufsatz eines Spaltlampenmikroskops vorgenommen werden. Der Schwellungsmesswert wird als Prozentsatz ausgedrückt und auf Basis der Hornhautdickenmesswerte nach folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{\text{Hornhautdicke zum Zeitpunkt } t - \text{Hornhautdicke zum Zeitpunkt } = 0}{\text{Hornhautdicke zum Zeitpunkt } = 0} \right) \times 100$$

46. Für alle getesteten Augen wird die mittlere Hornhautschwellung (in Prozent) für sämtliche Beobachtungszeitpunkte berechnet. Auf Basis des höchsten Mittelwertes für die Hornhautschwellung (beliebiger Beobachtungszeitpunkt) wird anschließend jeder Prüfchemikalie ein Gesamtwert für die Kategorie (*overall category score*) zugeordnet (siehe Nummer 51).
47. Die Hornhauttrübung wird anhand der Hornhautfläche bewertet, die am stärksten getrübt ist (siehe Tabelle 1). Für alle getesteten Augen wird der mittlere Trübungswert für jeden Beobachtungszeitpunkt berechnet. Auf Basis des höchsten Mittelwertes für die Hornhauttrübung (beliebiger Beobachtungszeitpunkt) wird anschließend jeder Prüfchemikalie ein Gesamtwert für die Kategorie (*overall category score*) zugeordnet (siehe Nummer 51).

Tabelle 1. Hornhauttrübungswerte

<u>Wert</u>	<u>Beobachtung</u>
0	keine Trübung
0,5	sehr schwache Trübung
1	gestreute oder diffuse Strukturen; Iris deutlich sichtbar
2	leicht erkennbare lichtdurchlässige Struktur; Iris weniger deutlich sichtbar
3	starke Hornhauttrübung; Einzelheiten der Iris nicht sichtbar; Pupillengröße kaum erkennbar
4	vollständige Trübung/Iris unsichtbar

48. Die Fluorescein-Verfärbung wird nur für den 30-minütigen Beobachtungszeitpunkt bewertet (siehe Tabelle 2). Anschließend wird für alle getesteten Augen die mittlere Fluorescein-Verfärbung für den 30-minütigen Beobachtungszeitpunkt berechnet und zur Ermittlung des jeder Prüfchemikalie zugeordneten Gesamtwertes für die Kategorie herangezogen (siehe Nummer 51).

Tabelle 2. Fluorescein-Verfärbungswerte

<u>Wert</u>	<u>Beobachtung</u>
0	keine Fluorescein-Verfärbung
0,5	sehr geringfügige Verfärbung einzelner Zellen
1	Verfärbung einzelner Zellen auf der gesamten behandelten Fläche der Hornhaut
2	Punktuelle oder konfluierende dichte Zellverfärbung
3	konfluierende großflächige Fluorescein-Verfärbung der Hornhaut

49. Morphologische Effekte umfassen „durchlöcherter“ Hornhaut-Epithelzellen, „abgelöster“ Epithelzellen, „aufgeraute“ Hornhautoberfläche und „Verklebung“ der Hornhaut mit der Prüfchemikalie. Diese Befunde können unterschiedlich stark ausgeprägt sein und gleichzeitig auftreten. Ihre Einstufung erfolgt subjektiv je nach Auswertung des Prüfers.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

50. Die Ergebnisse für die Hornhauttrübung, die Hornhautschwellung und die Fluorescein-Verfärbung sind einzeln zu evaluieren, um für jeden Endpunkt eine ICE-Klasse zu generieren. Kombiniert ergeben die ICE-Klassen für die einzelnen Endpunkte eine Reizklasse (*Irritancy Classification*) für die einzelnen Prüfchemikalien.

Entscheidungskriterien

51. Nach der Evaluierung jedes Endpunktes können die ICE-Klassen entsprechend einer vorgegebenen Spanne zugeordnet werden. Die Auswertung der Hornhautschwellung (Tabelle 3), der Hornhauttrübung (Tabelle 4) und der Fluorescein-Verfärbung (Tabelle 5) und ihre Einstufung in vier ICE-Klassen erfolgen anhand der nachstehenden Bewertungsskalen. Die Werte für die Hornhautschwellung in Tabelle 3 sind nur gültig, wenn die Dicke mit einem Spaltlampenmikroskop (z. B. Haag-Streit BP900) mit Tiefenmessgerät Nr. 1 und einer Spaltbreiteneinstellung von 9,5 (= 0,095 mm) gemessen wird. Anwender sollten sich darüber im Klaren sein, dass Spaltlampenmikroskope mit unterschiedlicher Spaltbreiteneinstellung unterschiedliche Dickenmesswerte ergeben können.

Tabelle 3. Kriterien für die Einstufung in ICE-Klassen – Hornhautschwellung

Mittlere Hornhautschwellung (in %)*	ICE-Klasse
0 bis 5	I
> 5 bis 12	II
> 12 bis 18 (>75 Minuten nach der Behandlung)	II
> 12 bis 18 (≤75 Minuten nach der Behandlung)	III
> 18 bis 26	III
> 26 bis 32 (>75 Minuten nach der Behandlung)	III
> 26 bis 32 (≤75 Minuten nach der Behandlung)	IV
> 32	IV

*Höchster Mittelwert für die Hornhauttrübung an einem beliebigen Beobachtungszeitpunkt

Tabelle 4. Kriterien für die Einstufung in ICE-Klassen – Hornhauttrübung

Höchster Mittelwert für die Hornhauttrübung*	ICE-Klasse
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

*Höchster Mittelwert an einem beliebigen Beobachtungszeitpunkt (auf Basis der Trübungswerte gemäß Tabelle 1).

Tabelle 5. Kriterien für die Einstufung in ICE-Klassen – mittlere Fluorescein-Verfärbung

Mittlere Verfärbung 30 Minuten nach der Behandlung*	ICE-Klasse
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

*Auf Basis der Werte gemäß Tabelle 2.

52. Die In-vitro-Klassifizierung einer Prüfchemikalie richtet sich nach der GHS-Klasse, die der Kombination von Kategorien entspricht, die für die Hornhautschwellung, die Hornhauttrübung und die Fluorescein-Verfärbung ermittelt wurden, und wird gemäß Tabelle 6 vorgenommen.

Tabelle 6. In-vitro-Gesamtklassifizierung

<u>UN-GHS-Klassifizierung</u>	<u>Kombinationen der drei Endpunkte</u>
Keine Einstufung	3 x I 2 x I, 1 x II
Keine Vorhersage möglich	Andere Kombinationen
Kategorie 1	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II* 2 x IV, 1 x I* Hornhauttrübung ≥ 3 nach 30 Min. (bei mindestens zwei Augen) Hornhauttrübung = 4 zu beliebigem Zeitpunkt (bei mindestens zwei Augen) starkes Ablösen der Epithel-Zellschicht (bei mindestens einem Auge)

*weniger gängige Kombinationen.

Studienakzeptanzkriterien

53. Ein Test gilt als akzeptabel, wenn die gleichzeitigen Negativ- oder Vehikel-/Lösungsmittelkontrollen sowie die gleichzeitigen Positivkontrollen „Keine Einstufung“ nach GHS bzw. GHS-Kategorie 1 ergeben.

Prüfbericht

54. Der Prüfbericht sollte die folgenden Informationen umfassen, soweit sie für die Studie relevant sind:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

- chemische Bezeichnung(en) wie der vom Chemical Abstracts Service (CAS) benutzte strukturelle Name, gefolgt von anderen Bezeichnungen, soweit bekannt;
- CAS-Registrierungsnummer (CAS-Nr.), soweit bekannt;
- Reinheit und Zusammensetzung der Prüfchemikalien/Kontrollchemikalien (in Gewichtsprozent), soweit diesbezügliche Informationen vorliegen;
- physikalisch-chemische Eigenschaften wie physikalischer Zustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, Stabilität, Chemikalienklasse, Wasserlöslichkeit, soweit sie für die Studie relevant sind;
- Behandlung der Prüfchemikalien/Kontrollchemikalien vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Stabilität, soweit bekannt.

Informationen zu Auftraggeber und Prüfanstalt

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Angaben zur Identifizierung der Bezugsquelle der Augen (z. B. Einrichtung, in der sie gewonnen wurden);

Testbedingungen

- Beschreibung des angewandten Testsystems;
- verwendetes Spaltlampenmikroskop (z. B. Modell) und Einstellungen des verwendeten Spaltlampenmikroskops;
- Verweis auf historische Ergebnisse von Negativ- und Positivkontrollen und gegebenenfalls historische Daten, die akzeptable Reihen gleichzeitiger Referenzkontrollen dokumentieren;
- das zur Gewährleistung der Integrität (d. h. Genauigkeit und Zuverlässigkeit) der Prüfmethode im Zeitverlauf angewandte Verfahren (z. B. regelmäßige Testung von Leistungschemikalien).

Gewinnung und Vorbereitung der Augen

- Alter und Gewicht des Spendertieres und, soweit verfügbar, andere spezifische Angaben zu den Tieren, von denen die Augen gewonnen wurden (z. B. Geschlecht, Stamm);
- Lager- und Transportbedingungen der Augen (z. B. Datum und Uhrzeit der Gewinnung der Augen, Zeitabstand zwischen der Gewinnung der Hühnerköpfe und dem Einsetzen der ausgeschälten Augen in die Superfusionskammer);
- Vorbereitung und Einsetzen der Augen, einschließlich Angaben zu ihrer Qualität, zur Temperatur der Augenkammern und zu den Kriterien für die Auswahl der bei den Tests

verwendeten Augen.

Testverfahren

- Anzahl der verwendeten Replikate;
- Identität der verwendeten Negativ- und Positivkontrollen (soweit zutreffend, auch der Lösungsmittel- und Referenzkontrollen);
- verwendete Dosis, Applikations- und Expositionsdauer der Prüfchemikalie;
- Beobachtungszeitpunkte (vor und nach der Behandlung);
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung der angewandten Studienakzeptanzkriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Testverfahren.

Ergebnisse

- tabellarische Aufstellung der Hornhautschwellungs-, Hornhauttrübungs- und Fluorescein-Verfärbungswerte für jedes einzelne Auge und an jedem Beobachtungszeitpunkt, einschließlich der Mittelwerte aller getesteten Augen an jedem Beobachtungszeitpunkt;
- höchster Mittelwert für die Hornhautschwellung, die Hornhauttrübung und die Fluorescein-Verfärbung an einem beliebigen Beobachtungszeitpunkt und die zugehörige ICE-Klasse;
- Beschreibung sonstiger festgestellter Wirkungen;
- die abgeleitete In-vitro-Klassifizierung nach GHS;
- gegebenenfalls Aufnahmen vom Auge.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerung

LITERATURHINWEISE

- (1) ICCVAM (2007). *Test Method Evaluation Report – In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives*. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm.
- (2) ESAC (2007). *Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants*. Verfügbar unter: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (3) ICCVAM (2010). *ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of in vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method*. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-Veröffentlichung Nr. 10-7553A. Verfügbar unter: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (4) Vereinte Nationen (UN) (2011). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, vierte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2011. Verfügbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) *Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion*. Series on Testing and Assessment Nr. 188 (Part 1 und Part 2), OECD, Paris.
- (6) Kapitel B.5 dieser Anlage, Akute Augenreizung/-verätzung.
- (7) Scott, L., Eskes, C., Hoffman, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Hamernik, K., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., Mcnamee, P., Osborn, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba, K., Vassallo, M., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vinardell, P., Zuang, V (2010). *A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches*. *Toxicology in Vitro*, 24, 1-9.

- (8) OECD (2011). *Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants*. Series on Testing and Assessment, Nr. 160, OECD, Paris.
- (9) ICCVAM (2006). *Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method*. NIH-Veröffentlichung Nr. 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Verfügbar unter: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.
- (10) Prinsen, M.K. und Koëter, B.W.M. (1993). *Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits*. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protokoll Nr. 80: *Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test*, 13pp. Verfügbar unter: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. und Spielmann H. (1995). *The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test*. *Toxicol. in Vitro*, 9:871-929.
- (13) Prinsen, M.K. (1996). *The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials*. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. und Prinsen, M.K. (1997). IRAG-Arbeitsgruppe I: *Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation*. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) Prinsen, M.K. (2006). *The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage?* *Toxicology in Vitro*, 20:78-81.
- (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. und das Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), *Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*. Verfügbar unter: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
- (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. und Jester, J.V. (2002). *Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays*. *Reg. Tox. Pharmacol.*, 36:106-117.
- (18) Burton, A.B.G., M. York und R.S. Lawrence (1981). *The in vitro assessment of severe irritants*. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*, 19:471-480.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Austauschbar mit „Reversible Wirkungen am Auge“ und mit der „UN-GHS-Kategorie 2“ (4).

Bottom-Up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zuerst Chemikalien, die keine Einstufung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Evidenzbasierte Bewertung: Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial einer Chemikalie entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller positiven Chemikalien, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Sie ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller negativen Chemikalien, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Sie ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

Fluorescein-Verfärbung: Subjektiver Messwert im Rahmen des ICE-Tests für die Fluorescein-Natrium-Verfärbung der Epithel-Zellen in der Hornhaut nach Applikation einer Prüfchemikalie. Das Ausmaß der Fluorescein-Verfärbung ist ein Indikator der Schädigung des Hornhautepithels.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Gemisch oder Lösung aus zwei oder mehr Stoffen, die nicht miteinander reagieren (4).

Genauigkeit: Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der

Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode.

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahrenklassifizierung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen zugeordnet werden kann, sind keine weiteren Testungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden kann.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (4).

Hornhaut: Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augeninnere übertragen wird.

Hornhautschwellung: Objektiver Messwert im Rahmen des ICE-Tests für die Umfangszunahme der Hornhaut nach Applikation einer Prüfchemikalie. Der Wert wird als Prozentsatz ausgedrückt und auf Basis von Referenz-Hornhautdickenmessungen (Messung vor der Applikation) und der in regelmäßigen Abständen nach der Applikation der Prüfchemikalie im ICE-Test aufgezeichneten Dicke berechnet. Das Ausmaß der Hornhautschwellung ist ein Indikator der Hornhautschädigung.

Hornhauttrübung: Messwert für die Undurchsichtigkeit der Hornhaut nach Applikation einer Prüfchemikalie. Eine verstärkte Hornhauttrübung ist ein Indikator für die Schädigung der Hornhaut.

Irreversible Wirkungen am Auge: siehe „Schwere Augenschädigung“ und „UN-GHS-Kategorie 1“.

Keine Einstufung nach UN-GHS: Stoffe, die die Voraussetzungen für eine Einstufung in die UN-GHS-Kategorien 1 oder 2 (2A oder 2B) nicht erfüllen. Austauschbar mit „Nicht eingestuft“.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Komponenten eines Testsystems enthält, einschließlich des Lösungsmittels oder Vehikels, und die mit den prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden, zu bestimmen. Bei der Testung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Testsystem interagiert.

Negativkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält. Diese Probe wird mit prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Testsystem interagiert.

Nicht eingestuft: Stoffe, die nicht als augenreizend (UN-GHS-Kategorie 2) oder schwer augenschädigend (UN-GHS-Kategorie 1) eingestuft sind. Austauschbar mit der UN-GHS-Klasse „Keine Einstufung“.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Referenzchemikalie: Eine zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendete Bezugsgröße. Eine Referenzchemikalie sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: i) beständige und zuverlässige Quelle(n); ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zur Klasse der geprüften Chemikalien; iii) bekannte physikalische/chemische Eigenschaften; iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und v) bekannte Potenz innerhalb der gewünschten Wirkungsspanne.

Reversible Wirkungen am Auge siehe „Augenreizung“ und „UN-GHS-Kategorie 2“.

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Austauschbar mit „Irreversible Wirkungen am Auge“ und mit „UN-GHS-Kategorie 1“ (4).

Spaltlampenmikroskop: Ein Instrument zur direkten Untersuchung des Auges, vergrößert mit einem binokularen Aufrechtbild-Stereomikroskop. Beim ICE-Test wird dieses Instrument eingesetzt, um die Vorderkammern des Hühnerauges visuell zu untersuchen und um die Hornhautdicke anhand eines Pachometer-Aufsatzes objektiv zu

messen.

Stoff: Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität notwendigen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können (4).

Tensid: Auch als oberflächenaktiver Stoff bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Stoffe, wie waschaktive Substanzen (Detergenzien), die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit herabsetzen und so die Bildung von Schaum oder das Eindringen in feste Stoffe ermöglichen; auch bekannt als Netzmittel.

Top-Down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zuerst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

UN-GHS-Kategorie 1: siehe „Schwere Augenschädigung“ und/oder „Irreversible Wirkungen am Auge“.

UN-GHS-Kategorie 2: siehe „Augenreizung“ und/oder „Reversible Wirkungen am Auge“.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet.

Anlage 2

LEISTUNGSCHEMIKALIEN FÜR DEN ICE

Vor der routinemäßigen Anwendung eines Tests, der den Anforderungen der vorliegenden Prüfmethode genügt, haben Laboratorien ihre technische Kompetenz nachzuweisen, indem sie die 13 in Tabelle 1 empfohlenen Chemikalien in die richtige Augengefährdungskategorie einstufen. Die Chemikalien wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Augengefährdungen repräsentieren, die auf den Ergebnissen des In-vivo-Kaninchenaugentests (TG 405) und dem UN-GHS-Klassifizierungssystem (d. h. den UN-GHS-Kategorien 1, 2A, 2B oder „Keine Einstufung“) basieren (4) (6). Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Chemikalien im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und das Vorhandensein hochwertiger Daten aus dem ICE-In-vitro-Test. Referenzdaten können aus dem SSD (5) und den *Background Review Documents* des ICCVAM für den ICE-Test bezogen werden (9).

Tabelle 1: Empfohlene Chemikalien für den Nachweis der technischen Kompetenz von Laboratorien zur Durchführung des ICE-Tests

Chemikalie	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ¹	Physikalischer Zustand	In-Vivo-Klassifizierung ²	In-Vitro-Klassifizierung ³
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumverbindung	flüssig	Kategorie 1	Kategorie 1
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, Amidin	fest	Kategorie 1	Kategorie 1
Dibenzoyl-D-Weinsäure	2743-38-6	Carbonsäure, Ester	fest	Kategorie 1	Kategorie 1
Imidazol	288-32-4	heterocyclisch	fest	Kategorie 1	Kategorie 1
Trichloressigsäure (30 %)	76-03-9	Carbonsäure	flüssig	Kategorie 1	Kategorie 1
2,6-Dichlorbenzoylchlorid	4659-45-4	Acylohalogenid	flüssig	Kategorie 2 A	Keine Vorhersage möglich ⁴
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Anorganisches Salz	fest	Kategorie 2A ⁵	Keine Vorhersage möglich ⁴
Ethyl-2-methylacetoacetat	609-14-3	Ketone, Ester	flüssig	Kategorie 2B	Keine Vorhersage möglich ⁴
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Organische Schwefelverbindung	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft
Glyzerin	56-81-5	Alkohol	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft (Grenzfall)

Methylcyclopentan	96-37-7	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft
n-Hexan	110-54-3	Kohlenwasserstoff (acyclisch)	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft
Triacetin	102-76-1	Lipid	flüssig	Nicht eingestuft	Nicht eingestuft

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

¹ Jede Prüfchemikalie wurde anhand einer Standard-Klassifizierungsregelung auf Basis des Klassifizierungssystems der National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) einer Chemikalienklasse zugeordnet (abrufbar über <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

² gestützt auf Ergebnisse aus dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) unter Verwendung des UN-GHS-Klassifizierungssystems (4)(6).

³ gestützt auf Ergebnisse des ICE-Tests gemäß Tabelle 6.

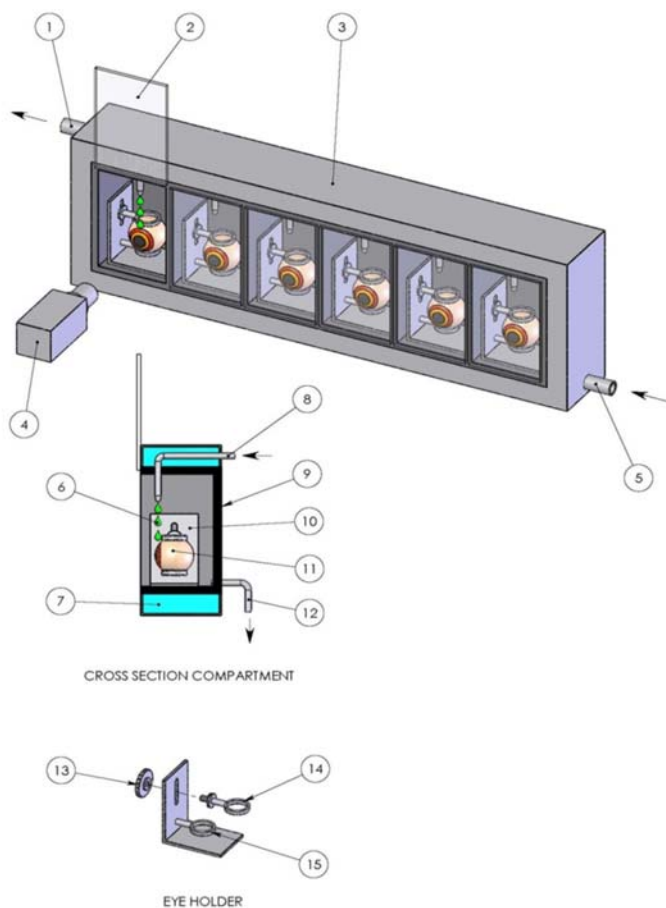
⁴ Kombination anderer ICE-Werte als der in Tabelle 6 angegebenen Werte zur Identifizierung der GHS-Kategorie „Keine Einstufung“ und der GHS-Kategorie 1 (siehe Tabelle 6).

⁵ Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Bindehautrötung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Das eine Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wies (an Tag 7) einen Bindehautrötungswert von 1 auf, der an Tag 10 ganz zurückging.

Anlage 3

SCHAUBILDER DES ICE-SUPERFUSIONSGERÄTS UND DER ICE-AUGENKLEMMEN

(Siehe Burton et al. (18) für weitere generische Beschreibungen von Superfusionsgeräten und Augenklemmen)



Nr.	Beschreibung	Nr.	Beschreibung
1	Warmwasserauslass	9	Kammer
2	Schiebefenster	10	Augenhalter
3	Superfusionsgerät	11	Hühnerauge
4	Optisches Messinstrument	12	Auslass Kochsalzlösung
5	Warmwassereinlass	13	Feststellschraube
6	Kochsalzlösung	14	Oberer justierbarer Fixierarm
7	Warmes Wasser	15	Unterer unbeweglicher Fixierarm
8	Einlass Kochsalzlösung		

“

(14) In Teil B erhält Kapitel B.49 folgende Fassung:

„B.49 In-vitro-Mikronukleustest an Säugetierzellen

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 487 (2016) und ist Teil einer Reihe von Prüfmethoden zur genetischen Toxikologie. Es wurde ein OECD-Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen dieser Prüfrichtlinien enthält (1).
2. Der In-vitro-Mikronukleustest (MNvit) ist ein Genotoxizitätstest zum Nachweis von Mikronuklei im Zytoplasma von Interphasezellen. Mikronuklei oder Mikrokerne können aus azentrischen Chromosomenfragmenten (d. h. Chromosomen, denen ein Zentromer fehlt) oder aus ganzen Chromosomen entstehen, die während der Anaphase der Zellteilung nicht zu den Polen wandern können. Der MNvit-Test ist daher eine In-vitro-Methode, die eine breite Basis für die In-vitro-Erforschung potenzieller Chromosomenschädigungen bildet, da sowohl Aneugene als auch Klastogene (2) (3) in Zellen nachgewiesen werden können, die während oder nach Kontakt mit der Prüfchemikalie eine Zellteilung durchlaufen haben (weitere Einzelheiten siehe Nummer 13). Mikrokerne stellen auf Tochterzellen übertragene Schäden dar, während in Metaphasezellen festgestellte Chromosomenaberrationen unter Umständen nicht übertragen werden. In beiden Fällen sind die Veränderungen möglicherweise nicht mit dem Überleben der Zellen kompatibel.
3. Die vorliegende Prüfmethode gestattet die Verwendung von Protokollen mit und ohne den Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin B (cytoB). Durch Beigabe von cytoB vor der Mitose entstehen Zellen mit zwei Kernen. Dies ermöglicht die Identifizierung und selektive Analyse von Mikrokernen in Zellen, die eine Mitose durchlaufen haben (4) (5). Diese Prüfmethode gestattet auch die Verwendung von Protokollen ohne Zytokinese-Block, vorausgesetzt, es gibt Beweise dafür, dass die analysierte Zellpopulation eine Mitose vollzogen hat.
4. Zusätzlich zum MNvit-Test zur Identifizierung von Chemikalien, die Mikrokerne erzeugen, können auch die immunchemische Markierung von Kinetochoren oder die Hybridisierung mit Zentromer- bzw. Telomer-Sonden (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)) zusätzliche Informationen über die Mechanismen der Chromosomenschädigung und der Bildung von Mikrokernen liefern (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Diese Markierungs- und Hybridisierungsverfahren können angewandt werden, wenn eine verstärkte Mikrokernbildung festgestellt wird und der Prüfer erkennen will, ob diese Zunahme das Ergebnis klastogener und/oder aneugener Ereignisse ist.

5. Da Mikrokerne in Zellen im Stadium der Interphase mit relativer Objektivität bewertet werden können, muss das Laborpersonal nur bestimmen, wie viele Zellen zwei Kerne (bei Hinzufügung von cytoB) bzw. (in allen anderen Fällen) wie viele Zellen einen Mikrokern enthalten. Infolgedessen können die Objektträger relativ schnell bewertet werden, und die Analyse lässt sich automatisieren. Dies macht es praktisch möglich, Tausende statt Hunderte von Zellen pro Behandlung zu bewerten und so die Aussagekraft des Tests zu erhöhen. Da schließlich die Mikrokerne von verzögert transportierten Chromosomen herrühren können, besteht die Möglichkeit, Aneuploidie induzierende Agenzien nachzuweisen, deren Untersuchung in konventionellen Chromosomenaberrationstests nur schwer möglich ist, z. B. Kapitel B.10 dieses Anhangs (18). Allerdings gestattet der in dieser Prüfmethode beschriebene MNvit-Test die Differenzierung zwischen Veränderungen der Chromosomenzahl und/oder Polyploidie induzierenden Chemikalien und Klastogenizität verursachenden Chemikalien nur, wenn besondere Techniken wie die unter Nummer 4 genannte FISH eingesetzt werden.
6. Der MNvit-Test ist zuverlässig und kann bei einer Vielfalt von Zelltypen, mit oder ohne Zusatz von cytoB, durchgeführt werden. Umfassende Daten belegen die Validität des MNvit-Tests bei Verwendung unterschiedlicher Zelltypen (kultivierter Zelllinien oder primärer Zellkulturen) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Hierzu zählen insbesondere die internationalen Validierungsstudien, koordiniert durch die Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23), und die Berichte des International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Die verfügbaren Daten wurden außerdem vom Europäischen Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM) der Europäischen Kommission in einer retrospektiven Validierungsstudie nach dem *Weight-of-Evidence*-Ansatz neu bewertet, und die Prüfmethode wurde vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVAM als wissenschaftlich validiert anerkannt (37) (38) (39).
7. Beim MNvit-Test an Säugetierzellen können kultivierte Zelllinien oder primäre Zellkulturen menschlichen Ursprungs oder von Nagetieren zum Einsatz kommen. Da die Hintergrundfrequenz von Mikrokernen die Empfindlichkeit des Tests beeinflusst, empfiehlt es sich, Zelltypen mit einer stabilen und festgelegten Hintergrundfrequenz der Mikrokernbildung zu verwenden. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur, der Karyotypstabilität (einschließlich Chromosomenzahl) und der spontanen Häufigkeit von Mikrokernen ausgewählt (40). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt lassen die verfügbaren Daten keine konkreten Empfehlungen zu, deuten jedoch darauf hin, dass es bei der Bewertung chemischer Gefahren wichtig ist, den *p53*-Status, die genetische (Karyotyp-)Stabilität, die DNA-Reparaturfähigkeit und die Herkunft (Nagetier oder Mensch) der für die Tests ausgewählten Zellen zu berücksichtigen. Anwendern dieser Prüfmethode wird daher empfohlen, den Einfluss dieser und anderer Zelleigenschaften auf die Leistung einer Zelllinie bei der Erkennung

der Mikrokerninduktion zu berücksichtigen, da sich die Erkenntnisse auf diesem Gebiet ständig weiterentwickeln.

8. Es gelten die Definitionen gemäß Anlage 1.

VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

9. In vitro durchgeführte Tests erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Stoffwechselaktivierungssystems, sofern die Zellen nicht im Hinblick auf die Prüfchemikalien metabolisch kompetent sind. Mit diesem exogenen Stoffwechselaktivierungssystem lassen sich die In-vivo-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind auch Bedingungen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Ergebnissen führen, die nicht die Genotoxizität der Prüfchemikalie widerspiegeln. Dazu gehören unter anderem Veränderungen des pH-Wertes (41) (42) (43) bzw. der Osmolalität, Wechselwirkung mit dem Zellkulturmedium (44) (45) oder hochgradige Zytotoxizität (siehe Nummer 29).
10. Zur Analyse der Mikrokerninduktion ist es wesentlich, dass sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Kulturen eine Mitose durchlaufen haben. Das informativste Stadium für die Auswertung von Mikrokernen liegt in Zellen vor, die eine Mitose während oder nach der Behandlung mit der Prüfchemikalie vollzogen haben. Bei hergestellten Nanomaterialien sind besondere Anpassungen dieser Prüfmethode erforderlich, die hier jedoch nicht beschrieben werden.
11. Bevor die Prüfmethode auf ein Gemisch angewendet wird, um zu Regulierungszwecken Daten zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum, sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefern kann. Diese Überlegungen erübrigen sich, sofern die Durchführung von Tests für das Gemisch gesetzlich vorgeschrieben ist.

TESTPRINZIP

12. Zellkulturen menschlichen Ursprungs oder von Säugetieren werden sowohl mit als auch ohne exogene Stoffwechselaktivierung mit der Prüfchemikalie in Kontakt gebracht, außer wenn Zellen mit eigener adäquater Metabolisierungskapazität verwendet werden (siehe Nummer 19).
13. Während oder nach dem Kontakt mit der Prüfchemikalie werden die Zellen so lange kultiviert, dass Chromosomenschäden oder andere Wirkungen auf den Zellzyklus/die Zellteilung zur Bildung von Mikrokernen in Interphasezellen führen können. Zur Induktion einer Aneuploidie sollte die Prüfchemikalie während der Mitose vorhanden sein. Gewonnene und gefärbte Interphasezellen werden auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht. Im Idealfall sollten Mikrokerne nur in Zellen ausgewertet werden, die während des Kontakts mit der Prüfchemikalie oder ggf. während der Zeit nach

der Behandlung eine Mitose durchlaufen haben. In Kulturen, die mit einem Zytokinese-Blocker behandelt wurden, ist dies ohne Weiteres möglich, indem nur zweikernige Zellen ausgewertet werden. Wenn kein Zytokinese-Blocker verwendet wurde, ist es wichtig nachzuweisen, dass die analysierten Zellen aufgrund einer Zunahme der Zellpopulation wahrscheinlich während oder nach dem Kontakt mit der Prüfchemikalie eine Zellteilung durchlaufen haben. Bei allen Protokollen ist es wichtig nachzuweisen, dass sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den behandelten Kulturen eine Zellproliferation stattgefunden hat. Das Ausmaß der von der Prüfchemikalie induzierten Zytotoxizität oder Zytostase sollte in allen Kulturen bewertet werden, die auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht werden.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Zellen

14. Es können kultivierte primäre Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen oder anderen Säugetieren (7) (20) (46) (47) sowie verschiedene Zelllinien von Nagetieren wie CHO, V79, CHL/IU und L5178Y oder menschliche Zelllinien wie TK6 verwendet werden (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (siehe Nummer 6). Andere Zelllinien wie HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2-Zellen (52) (53), A549 und primäre Embryonalzellen des Syrischen Hamsters (54) wurden in Mikronukleustests verwendet, sind zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht umfassend validiert worden. Die Verwendung dieser Zelllinien und -typen sollte daher anhand ihrer nachgewiesenen Leistung im Test begründet werden, wie im Abschnitt „Akzeptanzkriterien“ beschrieben. CytoB kann Berichten zufolge das Wachstum von L5178Y-Zellen beeinträchtigen und wird daher bei dieser Zelllinie nicht empfohlen (23). Wenn aus Gründen des Tierschutzes primäre Zellen verwendet werden, sollten, soweit möglich, Zellen menschlichen Ursprungs in Betracht gezogen und nach humanethischen Grundsätzen und Vorschriften beprobt werden.
15. Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen sollten jungen (ca. 18- bis 35-jährigen) nicht rauchenden Personen ohne bekannte Erkrankung entnommen werden, die bekanntermaßen in letzter Zeit nicht mit genotoxischen Einwirkungen (z. B. in Form von Chemikalien oder ionisierender Strahlung) in einer Intensität in Kontakt gekommen sind, die zu einem Anstieg der Hintergrundrate von Mikrokernzellen führen würde. Dies stellt eine niedrige und gleichmäßige Hintergrundrate von Mikrokernzellen sicher. Die Hintergrundrate von Mikrokernzellen nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Dieser Trend ist bei Frauen ausgeprägter als bei Männern (55). Wenn Zellen von mehreren Spendern zur Verwendung gepoolt werden, ist die Anzahl der Spender anzugeben. Es muss nachgewiesen werden, dass sich die Zellen seit dem Beginn der Behandlung mit der Prüfchemikalie bis zur Zellentnahme geteilt haben. Zellkulturen werden in einer Phase des

exponentiellen Wachstums gehalten (Zelllinien) oder zur Teilung angeregt (primäre Lymphozytenkulturen), damit die Zellen in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus exponiert werden, da die Empfindlichkeit der Zellstadien gegenüber den Prüfchemikalien möglicherweise nicht bekannt ist. Die Primärzellen, die mit mitogenen Stoffen zur Teilung stimuliert werden müssen, werden in der Regel während der Behandlung mit der Prüfchemikalie nicht weiter synchronisiert (z. B. humane Lymphozyten nach einer 48-stündigen mitogenen Stimulierung). Die Verwendung synchronisierter Zellen während der Behandlung mit der Prüfchemikalie wird nicht empfohlen, kann jedoch zulässig sein, sofern sie begründet wird.

Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

16. Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, ggf. befeuchtete Atmosphäre mit einer CO₂-Konzentration von 5 %, Temperatur von 37 °C) zu verwenden. Zelllinien sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mykoplasmaverunreinigung zu überprüfen, und Zellen sollten bei Verunreinigung oder bei veränderter modaler Chromosomenzahl nicht herangezogen werden. Die normale Dauer des Zellzyklus bei den gewählten Zelllinien oder der im Prüflabor verwendeten primären Kulturen sollte bekannt sein und mit den veröffentlichten Zelleigenschaften übereinstimmen.

Vorbereitung der Kulturen

17. Zelllinien: Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Zellen in Suspensions- oder Monolayerkultur bis zum Zeitpunkt der Gewinnung weiterhin exponentiell wachsen (z. B. sollte eine Konfluenz bei in Monolayerkultur gezüchteten Zellen vermieden werden).
18. Lymphozyten: Mit einem Antikoagulans (z. B. Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten werden einem Kulturmedium beigegeben (z. B. bei humanen Lymphozyten für die Dauer von 48 Stunden), das ein Mitogen (z. B. Phytohämagglutinin (PHA) im Fall von humanen Lymphozyten) enthält, um eine Zellteilung vor der Behandlung mit der Prüfchemikalie und cytoB herbeizuführen.

Stoffwechselaktivierung

19. Bei Zellen mit ungeeigneter Stoffwechselkapazität sollten exogene metabolisierende Systeme eingesetzt werden. Das am häufigsten verwendete, standardmäßig empfohlene System, sofern nicht anders begründet, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (56) (57) oder einem Gemisch aus Phenobarbital und β -Naphthoflavon (58) (59) (60) vorbehandelt wurde. Das letztgenannte Gemisch verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente

organische Schadstoffe (61) und hat sich bei der Induktion von Mischfunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (58) (59) (60). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 2 % v/v verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Verwendung von Produkten, die den Mitoseindex senken, insbesondere Komplexbildnern für Calcium (62), sollte während der Behandlung vermieden werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig.

Vorbereitung der Prüfchemikalie

20. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfchemikalien können dem Versuchssystem vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind mithilfe geeigneter Änderungen an den Standardprotokollen, wie z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Gefäßen (63) (64) (65), zu prüfen. Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen.

Prüfbedingungen

Lösungsmittel

21. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalie gewährleistet ist, ohne dass die Durchführung des Versuchs negativ beeinträchtigt wird, z. B. durch Änderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen, Behinderung des Stoffwechselaktivierungssystems. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels (oder Kulturmediums) in Erwägung zu ziehen. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind Wasser oder Dimethylsulfoxid (DMSO). In der Regel sollen organische Lösungsmittel 1 % v/v nicht übersteigen. Wenn cytoB in DMSO gelöst wird, darf die für die Prüfchemikalie und cytoB verwendete Gesamtmenge an organischen Lösungsmitteln nicht mehr als 1 % v/v betragen; anderenfalls sind unbehandelte Kontrollen zu verwenden, um sicherzustellen, dass der Anteil an organischen Lösungsmitteln keine schädliche Wirkung hat. Wässrige Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) sollen 10 % v/v im Endmedium nicht übersteigen. Kommen weniger gründlich erprobte Lösungsmittel zur Verwendung (z. B. Ethanol oder Aceton), ist deren Verwendung durch Daten zu stützen, die ihre Verträglichkeit mit der Prüfchemikalie, mit dem Versuchssystem sowie ihre mangelnde Genotoxizität in der verwendeten Konzentration belegen. Liegen keine Daten vor, die dies belegen, ist es wichtig, unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1) sowie Lösungsmittelkontrollen einzubeziehen,

um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder chromosomalen Wirkungen (z. B. Aneuploidie oder Klastogenizität) ausgelöst werden.

Verwendung von cytoB als Zytokinese-Blocker

22. Eine der wichtigsten Überlegungen bei der Durchführung des MNvit-Tests gilt der Vergewisserung, dass die bewerteten Zellen während der Behandlung oder ggf. während der Inkubationszeit nach der Behandlung eine Mitose durchlaufen haben. Die Auswertung von Mikrokernen soll daher auf Zellen beschränkt werden, die während oder nach der Behandlung eine Mitose vollzogen haben. CytoB ist das am häufigsten verwendete Agens zur Zytokinese-Blockierung, da es den Aktinaufbau hemmt und somit die Trennung der Tochterzellen nach der Mitose verhindert, was wiederum zur Bildung zweikerniger Zellen führt (6) (66) (67). Zugleich kann bei Verwendung von cytoB die Auswirkung der Prüfchemikalie auf die Zellproliferationskinetik gemessen werden. CytoB sollte bei der Verwendung menschlicher Lymphozyten als Zytokinese-Blocker eingesetzt werden, da die Zellzyklendauer zwischen einzelnen Spendern variiert und nicht alle Lymphozyten auf Phytohämagglutinin reagieren. Bei anderen Zelltypen ist cytoB nicht zwingend erforderlich, sofern nachgewiesen werden kann, dass diese eine Teilung durchlaufen haben, wie unter Nummer 27 beschrieben. Außerdem wird cytoB im Allgemeinen nicht verwendet, wenn die Proben mithilfe durchflusszytometrischer Methoden auf Mikrokern untersucht werden.
23. Für jeden Zelltyp sollte das Labor die geeignete cytoB-Konzentration festlegen, um in den Lösungsmittelkontrollkulturen eine optimale Frequenz der zweikernigen Zellen zu erreichen. Ferner sollte die Konzentration nachweislich eine gute Ausbeute an zweikernigen Zellen zur Auswertung ergeben. Die geeignete cytoB-Konzentration liegt in der Regel zwischen 3 und 6 µ/ml (19).

Messung von Zellproliferation und Zytotoxizität und Wahl der Behandlungskonzentrationen

24. Bei der Festlegung der höchsten zu testenden Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, wie z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (siehe Nummer 29), Ausfällungen im Kulturmedium (siehe Nummer 30) oder ausgeprägten Änderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (siehe Nummer 9). Sofern die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich der pH-Wert auch durch Anwendung eines Puffers im Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.
25. Es werden Messungen der Zellproliferation vorgenommen, um sicherzustellen, dass genügend behandelte Zellen während des Tests eine Mitose durchlaufen haben und dass die Behandlungen bei geeigneten Zytotoxizitätsniveaus durchgeführt werden (siehe Nummer 29). Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne

Stoffwechselaktivierung und unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zelltod und -wachstum bestimmt werden (siehe Nummern 26 und 27). Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines ersten Vorversuchs nützlich sein kann, um die im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen besser bestimmen zu können, ist ein Vorversuch nicht zwingend erforderlich. Wird er durchgeführt, ersetzt er nicht die Messung der Zytotoxizität im Hauptversuch.

26. Die Behandlung von Kulturen mit cytoB und die Messung der relativen Häufigkeit von einkernigen, zweikernigen und mehrkernigen Zellen in der Kultur sind ein genaues Verfahren zur Quantifizierung des Effekts auf die Zellproliferation und die zytotoxische oder zytostatische Wirkung einer Behandlung (6) und stellen sicher, dass nur Zellen mikroskopisch bewertet werden, die während oder nach der Behandlung eine Teilung vollzogen haben. Es wird empfohlen, die zytotoxische und zytostatische Wirkung einer Behandlung mittels des Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) (6) (27) (68) oder des Replikationsindex (RI) bei mindestens 500 Zellen pro Kultur abzuleiten (Formeln siehe Anlage 2). Hierzu werden die Werte in behandelten Kulturen und Kontrollkulturen miteinander verglichen. Die Bewertung anderer Zytotoxizitäts-Indikatoren (z. B. Zellintegrität, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung, Zellzyklus) könnte ebenfalls nützliche Informationen liefern, darf jedoch nicht als Ersatz für den CBPI oder RI verwendet werden.
27. In Studien ohne cytoB muss nachgewiesen werden, dass sich die Zellen in der Kultur geteilt haben, sodass ein erheblicher Teil der bewerteten Zellen während oder nach Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Teilung durchlaufen hat. Anderenfalls kann es zu falsch negativen Reaktionen kommen. Die Messung der relativen Populationsverdopplung (RPD) oder der relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC) sind empfohlene Verfahren zur Schätzung der zytostatischen Wirkung einer Behandlung (17) (68) (69) (70) (71) (Formeln siehe Anlage 2). Bei längeren Probenahmephasen (z. B. Behandlung über einen Zeitraum von 1,5 bis 2 normalen Zellzykluslängen und Gewinnung nach weiteren 1,5 bis 2 normalen Zellzykluslängen, woraus sich eine Probenahmezeit von insgesamt mehr als 3 bis 4 normalen Zellzykluslängen ergibt, wie unter Nummern 38 und 39 beschrieben) könnte es bei der RPD zu einer Unterschätzung der Toxizität kommen (71). Unter diesen Umständen ist die RICC möglicherweise ein besseres Verfahren. Anderenfalls erhält man anhand einer Bewertung der Zytotoxizität nach 1,5 bis 2 normalen Zellzykluslängen einen hilfreichen Schätzwert. Die Bewertung anderer Marker für Zytotoxizität oder Zytostase (z. B. Zellintegrität, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung, Proliferationsindex (PI), Zellzyklus, nukleoplasmische Brücken oder Kernknospen) könnten nützliche Informationen liefern, dürfen jedoch nicht als Ersatz für die RPD oder die RICC verwendet werden.
28. Es sollten mindestens drei Versuchskonzentrationen (ausgenommen das Lösungsmittel und Positivkontrollen), die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität,

Anzahl der Zellen usw.), ausgewertet werden. Unabhängig von der Art der Zellen (Zelllinien oder Primärkulturen von Lymphozyten) können für jede überprüfte Konzentration Replikat- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Wenngleich die Verwendung von Zweifachkulturen ratsam ist, sind Einfachkulturen auch zulässig, vorausgesetzt, es wird für Einfach- oder Zweifachkulturen jeweils die gleiche Gesamt-Zellpopulation ausgewertet. Die Verwendung von Einzelkulturen ist insbesondere dann relevant, wenn mehr als drei Konzentrationen bewertet werden (siehe Nummern 44 und 45). Die Ergebnisse aus den unabhängigen Replikatkulturen bei einer festgelegten Konzentration können zu Datenanalysezwecken gepoolt werden. Bei Prüfchemikalien mit geringer oder keiner Zytotoxizität sind in der Regel Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die Prüfkonzentrationen einen Bereich ausgehend vom Wert, bei dem Zytotoxizität auftritt (siehe Beschreibung unter Nummer 29), bis zu Konzentrationen mit mäßiger oder geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Um Daten zu mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder um die Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Einzelnen auszuwerten, wird es daher erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als drei Konzentrationen zu verwenden (Einfach- oder Replikatkulturen), insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (siehe Nummer 60).

29. Beruht die höchste Konzentration auf der Zytotoxizität, sollte die Höchstkonzentration darauf abzielen, unter Verwendung der empfohlenen Zytotoxizitätsparameter (d. h. Verringerung der RICC und RPD bei Zelllinien, wenn cytoB nicht verwendet wird, und Verringerung des CBPI oder RI, wenn cytoB verwendet wird, auf 45 ± 5 % der gleichzeitigen Negativkontrollen) eine Zytotoxizität von 55 ± 5 % zu erreichen (72). Ausschließlich am oberen Ende dieses Zytotoxizitätsbereichs von 55 ± 5 % anzutreffende positive Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden (71).
30. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines Inversmikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, die eine Trübung oder sichtbare Ausfällung hervorruft, da artefaktische Wirkungen eine Folge dieser Ausfällung sein könnten. Bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, ist unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung nicht die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt (z. B. Färbung oder Auswertung). Es ist möglicherweise sinnvoll, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.
31. Wenn keine Ausfällung bzw. keine begrenzende Zytotoxizität festgestellt wird, sollte die Höchstkonzentration bei Versuchen 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml betragen, je nachdem,

welcher Wert am niedrigsten ist (73) (74) (75). Sofern die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht genau definiert ist, z. B. ein Stoff mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien (UVCB) (76), ein Umweltextrakt usw., muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. bei 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Bestandteile zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (93).

Kontrollen

32. Bei jedem Gewinnungszeitpunkt sind parallel laufende Negativkontrollen (siehe Nummer 21) anzulegen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen bearbeitet werden.
33. Gleichzeitige Positivkontrollen müssen durchgeführt werden, um die Eignung des Labors zum Nachweis von Klastogenen und Aneugenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls sowie ggf. die Wirksamkeit des exogenen Stoffwechselaktivierungssystems nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind nachstehender Tabelle 1 zu entnehmen. Es können andere geeignete Positivkontrollchemikalien verwendet werden, sofern dies begründet ist.
34. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind keine Aneugene bekannt, die zu ihrer genotoxischen Wirkung eine Stoffwechselaktivierung benötigen (17). Da In-vitro-Tests auf Genotoxizität in Säugetierzellen für die gleichzeitigen Kurzzeitbehandlungen mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems über die gleiche Behandlungsdauer ausreichend standardisiert sind, kann sich die Hinzuziehung von Positivkontrollen auf ein Klastogen beschränken, das eine Stoffwechselaktivierung erfordert. In diesem Fall wird durch die Reaktion einer einzelnen Positivkontrolle sowohl die Aktivität des Stoffwechselaktivierungssystems als auch die Reaktionsfähigkeit des Testsystems nachgewiesen. Im Falle einer Langzeitbehandlung (ohne S9) sollte jedoch eine gesonderte Positivkontrolle erfolgen, da die Behandlungsdauer beim Test mit Stoffwechselaktivierung eine andere ist. Wird als einzige Positivkontrolle für die Kurzzeitbehandlung mit und ohne Stoffwechselaktivierung ein Klastogen ausgewählt, sollte für die Langzeitbehandlung ohne Stoffwechselaktivierung ein Aneugen ausgewählt werden. Positivkontrollen für Klastogenizität und Aneugenizität sollten in metabolisch kompetenten Zellen verwendet werden, die kein S9 benötigen.
35. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt (d. h. die Wirkungen sind eindeutig, lassen aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen), und die Wirkung sollte nicht durch einen

Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in dieser Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet.

Tabelle 1. Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzchemikalien

Kategorie	Chemikalie	CAS-Nr.
1. Klastogene, die ohne Stoffwechselaktivierung wirken		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogene, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern		
	Benzo[a]pyren	50-32-8
	Cyclophosphamid	50-18-0
3. Aneugene		
	Colchicin	64-86-8
	Vinblastin	143-67-9

VERFAHREN

Behandlungsplan

36. Um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, dass ein Aneugen oder Klastogen in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus erkannt wird, muss eine ausreichende Anzahl an Zellen während aller Stadien ihrer Zellzyklen mit der Prüfchemikalie behandelt werden. Alle Behandlungen sollten während des exponentiellen Wachstums der Zellen beginnen und enden, und die Zellen sollten bis zum Zeitpunkt der Probenahme weiter wachsen. Der Behandlungsplan für Zelllinien und primäre Zellkulturen kann daher in gewisser Weise von dem für Lymphozyten abweichen, die für den Beginn ihres Zellzyklus einer mitogenen Stimulation bedürfen (17). Bei Lymphozyten ist es am wirksamsten, die Behandlung mit der Prüfchemikalie 44 bis 48 Stunden nach der PHA-Stimulation zu beginnen, wenn sich die Zellen asynchron teilen (6).

37. Veröffentlichte Daten (19) legen nahe, dass die meisten Aneugene und Klastogene entdeckt werden, wenn eine kurze Behandlung von 3 bis 6 Stunden mit oder ohne Vorhandensein von S9 erfolgt, woraufhin die Prüfchemikalie entfernt wird und die Zellen in einem Zeitraum beprobt werden, der etwa der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (7).
38. Für eine gründliche Bewertung, die erforderlich wäre, um auf ein negatives Ergebnis zu schließen, sollten bei Durchführung einer Kurzzeitbehandlung mit und ohne Stoffwechselaktivierung und einer Langzeitbehandlung ohne Stoffwechselaktivierung alle drei der folgenden Versuchsbedingungen angewandt werden, und zwar eine (siehe Nummern 56, 57 und 58):
- Die Zellen sollten 3 bis 6 Stunden lang ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems mit der Prüfchemikalie behandelt werden und in einem Zeitraum beprobt werden, der etwa der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (19).
 - Die Zellen sollten 3 bis 6 Stunden lang mit Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems mit der Prüfchemikalie behandelt werden und in einem Zeitraum beprobt werden, der etwa der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (19).
 - Die Zellen sollten kontinuierlich ohne Stoffwechselaktivierung behandelt werden, wobei eine Beprobung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht.

Führt eine der oben genannten Versuchsbedingungen zu einem positiven Befund, ist es möglicherweise nicht erforderlich, Untersuchungen anhand der anderen Behandlungsverfahren durchzuführen.

Wenn bekannt ist oder der Verdacht besteht, dass die Prüfchemikalie die Dauer des Zellzyklus beeinflusst (z. B. bei der Prüfung von Nucleosidanalogen), was insbesondere für p53-kompetente Zellen gilt (35) (36) (77), können die Zeiträume für die Probenahme oder Regenerierung um bis zu eine weitere 1,5-fache bis 2-fache Dauer des normalen Zellzyklus (d. h. insgesamt die 3-fache bis 4-fache Dauer des Zellzyklus nach Beginn der Kurzzeit- und Langzeitbehandlungen) ausgedehnt werden. Diese Optionen beziehen sich auf Situationen, in denen mögliche Wechselwirkungen zwischen der Prüfchemikalie und cytoB befürchtet werden. Bei verlängerten Probenahmezeiten (d. h. einer Kulturzeit von insgesamt der 3-fachen bis 4-fachen Zellzyklusdauer) ist unbedingt sicherzustellen, dass sich die Zellen noch aktiv teilen. Bei Lymphozyten beispielsweise kann das exponentielle Wachstum 96 Stunden nach der Stimulation nachlassen, und Monolayerkulturen können konfluent werden.

39. Die empfohlenen Pläne für die Zellbehandlung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Diese allgemeinen Behandlungspläne können je nach Stabilität oder Reaktivität der

Prüfchemikalie oder den besonderen Wachstumseigenschaften der verwendeten Zellen (mit entsprechender Begründung) modifiziert werden.

Tabelle 2. Zellbehandlung und Entnahmezeitpunkte beim MNvit-Test

Lymphozyten, Primärzellen und Zelllinien, die mit cytoB behandelt wurden	+ S9 Kurzzeitbehandlung	3-6 Stunden Behandlung in Anwesenheit von S9; Entfernung von S9 und Behandlungsmedium; Zugabe von neuem Medium und cytoB; Zellentnahme nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen nach Behandlungsbeginn.
	- S9 Kurzzeitbehandlung	3-6 Stunden Behandlung; Entfernung des Behandlungsmediums; Zugabe von neuem Medium und cytoB; Zellentnahme nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen nach Behandlungsbeginn.
	- S9 Verlängerte Behandlung	Behandlung über 1,5-2,0 normale Zellzyklen in Anwesenheit von cytoB; Zellentnahme am Ende der Behandlungsdauer.
<p><u>Ohne</u> cytoB behandelte Zelllinien</p> <p>(Identisch mit den obigen Behandlungsplänen mit der Ausnahme, dass kein cytoB zugegeben wird)</p>		

40. Bei Monolayerkulturen können am Ende der 3- bis 6-stündigen Behandlung mitotische Zellen vorhanden sein (erkennbar daran, dass sie rund sind und sich von der Oberfläche ablösen). Da diese mitotischen Zellen sich leicht lösen, können sie bei Entfernung des Mediums mit der Prüfchemikalie verloren gehen. Kann nachgewiesen werden, dass die Zahl der mitotischen Zellen gegenüber den Kontrollen erheblich zugenommen hat, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen mitotischen Arrest hinweist, sollten die Zellen durch Zentrifugieren gewonnen und anschließend der Kultur wieder zugeführt werden, um zu vermeiden, dass Zellen verlorengehen, die sich in der Mitose befinden und zum Zeitpunkt der Gewinnung dem Risiko einer Mikrokernbildung/Chromosomenaberration ausgesetzt sind.

Zellgewinnung und Präparation des Objektträgers

41. Jede Kultur wird gesondert gewonnen und aufbereitet. Die Zellpräparation kann eine Behandlung mit hypotoner Lösung beinhalten, dieser Schritt ist jedoch nicht notwendig, wenn eine angemessene Ausbreitung der Zellen anderweitig sichergestellt wird. Bei der Präparation der Objektträger können verschiedene Techniken angewandt werden, vorausgesetzt, es werden Zellpräparate hoher Qualität zur Auswertung bereitgestellt. Dabei sollten Zellen mit intakter Zellmembran und intaktem Zytoplasma zurückgehalten

werden, um die Erkennung von Mikrokernen sowie (bei der Zytokinese-Block-Methode) die zuverlässige Identifizierung zweikerniger Zellen zu ermöglichen.

42. Die Objektträger können mit verschiedenen Verfahren angefärbt werden, beispielsweise mit Giemsa oder fluoreszierenden DNA-spezifischen Farbstoffen. Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs (z. B. Acridin Orange (78) oder Hoechst 33258 Plus Pyronin-Y (79)) lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei der Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Zur Identifizierung des Inhalts (ganze Chromosomen werden eingefärbt, azentrische Chromosomenfragmente nicht) von Mikrokernen können Anti-Kinetochor-Antikörper, FISH mit panzentromerischen DNA-Sonden oder eine präparierte In-situ-Markierung mit panzentromer-spezifischen Primern, zusammen mit der geeigneten DNA-Gegenfärbung, verwendet werden, wenn mechanistische Informationen zu ihrer Bildung benötigt werden (16) (17). Andere Methoden zur Unterscheidung zwischen Klastogenen und Aneugenen können ebenfalls angewandt werden, wenn sie sich als wirksam erwiesen haben. Beispielsweise könnten bei bestimmten Zelllinien die Messungen von sub-2N-Kernen als hypodiploide Ereignisse mittels Techniken wie Bildanalyse, Laser-Scan-Zytometrie oder Durchflusszytometrie ebenfalls nützliche Informationen liefern (80) (81) (82). Morphologische Beobachtungen von Kernen könnten ebenfalls auf eine mögliche Aneuploidie hinweisen. Ein Test auf Chromosomenaberrationen in der Metaphase, vorzugsweise am gleichen Zelltyp und unter Verwendung eines Protokolls mit vergleichbarer Empfindlichkeit, könnte ebenfalls eine nützliche Methode sein, um festzustellen, ob die Mikrokerne auf einen Chromosomenbruch zurückzuführen sind (in dem Wissen, dass ein Chromosomenverlust mit dem Test auf Chromosomenaberrationen nicht erkannt würde).

Analyse

43. Alle Objektträger, auch die für das Lösungsmittel und die unbehandelten Kontrollen (sofern verwendet) und die Positivkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung der Mikrokernfrequenzen von unabhängiger Seite zu kodieren. Bei der Verwendung eines automatisierten Auswertungssystems, wie Durchflusszytometrie, Laser-Scan-Zytometrie oder Bildanalyse, sollten geeignete Techniken zum Ausgleich systematischer Messfehler verwendet werden. Unabhängig davon, welche automatisierte Plattform zur Zählung der Mikrokerne verwendet wird, sind CBPI, RI, RPD oder RICC parallel auszuwerten.
44. In Kulturen, die mit cytoB behandelt wurden, sind die Mikrokernfrequenzen von mindestens 2000 zweikernigen Zellen pro Konzentration und Kontrolle (83) zu analysieren, die, sofern Replikate verwendet werden, gleichmäßig auf die Replikate verteilt sein sollten. Bei der Verwendung von Einfachkulturen pro Dosis (siehe Nummer 28) sollten in einer solchen Kultur mindestens 2000 zweikernige Zellen pro Kultur (83) ausgewertet werden. Wenn wesentlich weniger als 1000 zweikernige Zellen pro Kultur (bei Zweifachkulturen) bzw. 2000 (bei Einfachkulturen) in jeder Konzentration

für die Auswertung zur Verfügung stehen und wenn keine signifikante Zunahme an Mikrokernen festgestellt wird, ist der Test mit einer höheren Anzahl an Zellen oder mit weniger zytotoxischen Konzentrationen zu wiederholen, je nachdem, was angemessen ist. Es ist darauf zu achten, dass keine zweikernigen Zellen ausgewertet werden, die unregelmäßige Formen aufweisen oder deren zwei Kerne in der Größe beträchtlich voneinander abweichen. Außerdem dürfen zweikernige Zellen nicht mit schlecht auf dem Träger verteilten mehrkernigen Zellen verwechselt werden. Zellen mit mehr als zwei Hauptkernen werden nicht auf Mikrokern untersucht, da in diesen Zellen die zugrunde liegende Mikrokernfrequenz höher sein könnte (84). Die Auswertung einkerniger Zellen ist akzeptabel, wenn die Prüfchemikalie die Wirkung von cytoB beeinträchtigt. In diesen Fällen könnte ein Wiederholungstest ohne cytoB sinnvoll sein. Die Auswertung einkerniger Zellen zusätzlich zu den zweikernigen Zellen könnte nützliche Informationen liefern (85) (86), ist jedoch nicht zwingend erforderlich.

45. In Zelllinien, die ohne cytoB-Behandlung getestet wurden, sind die Mikrokern in mindestens 2000 Zellen pro Prüfkonzentration und Kontrolle (83) zu analysieren, die, sofern Replikate verwendet werden, gleichmäßig auf die Replikate verteilt sein sollten. Bei der Verwendung von Einzelkulturen je Konzentration (siehe Nummer 28) sind in dieser Kultur mindestens 2000 Zellen auszuwerten. Wenn wesentlich weniger als 1000 Zellen pro Kultur (bei Zweifachkulturen) bzw. 2000 Zellen (bei Einfachkulturen) in jeder Konzentration für die Auswertung zur Verfügung stehen und wenn keine signifikante Zunahme an Mikrokernen festgestellt wird, ist der Test mit einer höheren Anzahl an Zellen oder mit weniger zytotoxischen Konzentrationen zu wiederholen, je nachdem, was angemessen ist.
46. Wenn cytoB verwendet wird, ist von mindestens 500 Zellen pro Kultur ein CBPI oder RI zur Bewertung der Zellproliferation (siehe Anlage 2) festzulegen. Werden die Behandlungen ohne cytoB durchgeführt, muss unbedingt nachgewiesen werden, dass die Zellen in der Kultur eine Zellteilung vollzogen haben, wie unter den Nummern 24 bis 28 erläutert.

Kompetenz des Labors

47. Um ausreichende Erfahrungen mit der Prüfung zu sammeln, bevor routinemäßige Tests erfolgen, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzchemikalien durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen (mindestens einer mit und einer ohne Stoffwechselaktivierung sowie einer mit einem aneugenem Wirkmechanismus, ausgewählt aus den in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien) und verschiedener Negativkontrollen (einschließlich unbehandelter Kulturen und verschiedener Lösungsmittel/Vehikel) bedienen. Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten mit der Literatur im Einklang stehen. Dies gilt nicht für erfahrene Labors, d. h. für

Labors, die über eine Datenbank mit historischen Daten gemäß der Definition unter den Nummern 49 bis 52 verfügen.

48. Eine Auswahl von Positivkontrollchemikalien (siehe Tabelle 1) sollte anhand von Kurz- und Langzeitbehandlungen ohne Stoffwechselaktivierung und darüber hinaus anhand einer Kurzzeitbehandlung mit Stoffwechselaktivierung untersucht werden, um die Fähigkeit des Labors zum Nachweis klastogener und aneugener Chemikalien, zur Bestimmung der Wirksamkeit des Stoffwechselaktivierungssystems und des Nachweises der Eignung der Auswertungsverfahren (visuelle mikroskopische Untersuchung, Durchflusszytometrie, Laser-Scan-Zytometrie oder Bildanalyse) zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollte eine Spanne der Konzentrationen der ausgewählten Chemikalien festgelegt werden, um reproduzierbare und konzentrationsbezogene Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

49. Das Labor sollte Folgendes bestimmen:

- Bereich und Verteilung historischer Positivkontrollen
- Bereich und Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel)

50. Bei der erstmaligen Erfassung von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Negativkontrolldaten entsprechen, sofern solche vorhanden sind. Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb von 95 % der Kontrollgrenzen der gewählten Verteilung liegen (87) (88). Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten (88)), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor „unter Kontrolle“ ist (83). Weitere Empfehlungen zum Aufbau und zur Verwendung von Sammlungen historischer Daten (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus historischen Datensätzen und die Gültigkeitskriterien für einen bestimmten Versuch) sind den Literaturangaben zu entnehmen (87).

51. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen historischen Kontrolldaten zu prüfen. Bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue historische Kontrolldatenbank erstellt werden.

52. Negativkontrolldaten sollten das Auftreten von Zellen mit Mikrokernen aus einer Einzelkultur oder aus einer Summe von Replikatkulturen erfassen (vgl. Beschreibung unter Nummer 28). Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der gewählten Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen (87) (88). Sofern gleichzeitige Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Testsystem „unter Kontrolle“ ist (siehe Nummer 50) und nachweislich kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Interpretation der Ergebnisse

53. Bei Verwendung des Zytokinese-Block-Verfahrens werden nur die Frequenzen zweikerniger Zellen mit Mikrokernen (unabhängig von der Anzahl der Mikrokerne pro Zelle) zur Bewertung der Mikrokern-Induktion herangezogen. Die Auswertung der Anzahl an Zellen mit einem, zwei oder mehr Mikrokernen kann separat ausgewiesen werden und könnte nützliche Informationen liefern, ist jedoch nicht zwingend notwendig.
54. Festzulegen sind auch Maßnahmen, die gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität und/oder Zytostase aller behandelten Kulturen und aller Negativ- und Positivkontrollkulturen durchgeführt werden (16). Der CBPI oder der RI ist für alle behandelten Kulturen und Kontrollkulturen zu berechnen, da sich bei Anwendung der Zytokinese-Block-Methode die Messungen des Zellzyklus verzögern. Kommt cytoB nicht zum Einsatz, sollte die relative Populationsverdopplung (RPD) oder die relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) herangezogen werden (siehe Anlage 2).
55. Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

Gültigkeitskriterien

56. Die Akzeptanz eines Versuchs beruht auf folgenden Kriterien:
- Die Aufnahme der gleichzeitigen Negativkontrolle in die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen ist zulässig, wenn sie der Beschreibung unter Nummer 50 entspricht.
 - Gleichzeitige Positivkontrollen (siehe Nummer 50) sollten Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank zu historischen

Positivkontrollen erzeugt werden, und eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber den gleichzeitigen Negativkontrollen aufweisen.

- Die Kriterien für die Zellproliferation in der Lösungsmittelkontrolle müssen erfüllt sein (Nummern 25, 26 und 27).
- Es wurden alle drei Versuchsbedingungen getestet, es sei denn, eine führte zu positiven Ergebnissen (Nummern 36-40).
- Eine angemessene Zahl an Zellen und Konzentrationen ist analysierbar (Nummer 28 sowie Nummern 44, 45 und 46).
- Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 24-31.

Bewertung und Interpretation der Ergebnisse

57. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn unter den geprüften Versuchsbedingungen (siehe Nummern 36-39)

- mindestens eine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist (89),
- die Zunahme unter mindestens einer Versuchsbedingung bei der Bewertung anhand eines geeigneten Trendtests dosisabhängig ist (siehe Nummer 28),
- eines der Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %, siehe Nummer 52).

Sind alle diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie in diesem Testsystem Chromosomenbrüche und/oder Gewinn bzw. Verlust von Chromosomenmaterial auslösen kann. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (90) (91) (92).

58. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn unter allen geprüften Versuchsbedingungen (siehe Nummern 36-39)

- keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- die Bewertung anhand eines geeigneten Trendtests keine dosisabhängige Zunahme ergibt,

- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenzen von 95 %, siehe Nummer 52).

In diesem Fall wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Chromosomenbrüche und/oder Gewinn bzw. Verlust von Chromosomenmaterial in diesem Testsystem auslösen kann. Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden sind der Literatur zu entnehmen (90) (91) (92).

59. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.
60. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, und/oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Auswertung weiterer Zellen oder die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen (z. B. Abstände der Konzentrationen, andere Stoffwechselaktivierungsbedingungen (d. h. Konzentration oder Herkunft von S9), könnte gegebenenfalls hilfreich sein.
61. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen, und es wird daher die Schlussfolgerung gezogen, dass die Reaktion nicht eindeutig ist.
62. Wenn Prüfchemikalien im MNvit-Test Mikrokerne induzieren, kann dies darauf zurückzuführen sein, dass sie Chromosomenbrüche, Chromosomenverlust oder eine Kombination aus beidem verursachen. Deshalb können weitere Analysen unter Einsatz von Anti-Kinetochor-Antikörpern, zentromer-spezifischen In-situ-Sonden oder mithilfe sonstiger Methoden vorgenommen werden, um festzustellen, ob der Mechanismus der Mikrokern-Induktion von einer klastogenen und/oder aneugenen Wirkung herrührt.

Testbericht

63. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Reaktivität der Prüfchemikalien mit dem Lösungsmittel/Vehikel oder dem Zellkulturmedium;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;

- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentige Substanz:

- Aussehen, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, falls zutreffend und praktisch durchführbar usw.

Mehrkomponentige Substanz, UVCB-Stoffe und Gemische:

- So weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels;
- Anteil des Lösungsmittels im endgültigen Kulturmedium.

Zellen:

- Typ und Herkunft der verwendeten Zellen;
- Eignung des verwendeten Zelltyps;
- bei Zelllinien: Nichtvorhandensein von Mykoplasma;
- bei Zelllinien: Angaben über die Dauer des Zellzyklus oder den Proliferationsindex;
- bei Verwendung von Lymphozyten: Geschlecht und Alter der Blutspender, sachdienliche Informationen zum Spender, Vollblut oder separierte Lymphozyten, verwendetes Mitogen;
- normale Zellzyklusdauer (Negativkontrolle);
- bei Zelllinien: ggf. Passagenanzahl;
- bei Zelllinien: zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- bei Zelllinien: Modalwert der Chromosomen.

Prüfbedingungen:

- Bezeichnung des Zytokinese-Block-Stoffs (z. B. cytoB), falls verwendet, dessen Konzentration und Dauer der Zellexposition;
- Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums);
- Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;
- Medienzusammensetzung, ggf. CO₂-Konzentration, Feuchtigkeit;
- Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der dem Kulturmedium beigegebenen Prüfchemikalie;
- Inkubationstemperatur und -dauer;
- Behandlungsdauer;
- Zeitpunkt der Gewinnung nach der Behandlung;
- ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und von S9 im Endmedium), Qualitätskontrollen von S9 (z. B. enzymatische Aktivität, Sterilität, Stoffwechselfähigkeit);
- Positiv- und Negativkontrollchemikalien, Endkonzentrationen, Bedingungen sowie Behandlungsdauer und Regenerationszeit;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers und verwendete Färbetechnik;
- Kriterien für die Auswertung von Mikrokernzellen (Auswahl der analysierbaren Zellen und Identifizierung von Mikrokernen);
- Anzahl der analysierten Zellen;
- Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;
- evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;
- verwendete statistische Analysemethode(n);
- Methoden, z. B. die Verwendung von Kinetochor-Antikörpern oder Pan-Zentromer-Sonden, um ggf. zu beschreiben, ob Mikrokerne ganze oder fragmentierte Chromosomen enthalten;

- Methoden zur Bestimmung von pH-Wert, Osmolalität und Ausfällung.

Ergebnisse:

- Definition geeigneter Zellen für die Analyse;
- bei Zelllinien: für jede Kultur die Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der gewonnenen Zellen, wenn kein cytoB verwendet wird;
- verwendete Messung der Zytotoxizität, z. B. CBPI oder RI bei der Zytokinese-Block-Methode; RICC oder RPD, wenn keine Zytokinese-Block-Verfahren verwendet werden; sonstige Beobachtungen bei Bedarf (z. B. Zell-Konfluenz, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung, Frequenz zweikerniger Zellen);
- Ausfällungszeichen und Bestimmungszeit;
- Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;
- Verteilung einkerniger, zweikerniger und mehrkerniger Zellen, falls eine Zytokinese-Block-Methode verwendet wird;
- Anzahl der Zellen mit Mikrokernen, gesondert für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur, und Angabe, ob diese von zweikernigen oder einkernigen Zellen stammen, sofern zutreffend;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen und 95 %-Grenzen für die Verteilung sowie Anzahl der Datensätze;
- statistische Analysen, ggf. p-Werte.

Diskussion der Ergebnisse:

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, 233-246.
- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutation Research*, Vol. 6/4, 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutation Research*, Vol. 8/4, 329-334.

- (12) Henderson, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutation Research*, Vol. 8/6, 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence in situ hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, 153-163.
- (18) Kapitel B.10: In-Vitro-Test auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, 88-124.
- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, 125-152.

- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, 45-59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, *Mutation Research*, Vol. 410, 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* 1999. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* 1999. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* 1999. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutation Research*, Vol. 14/6, 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Sonderausgabe: SFTG International collaborative study on in vitro micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the in vitromicronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the in vitro micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, 28-36.

- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25. Sitzung des ESAC, 16./17. November 2006, verfügbar unter: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). Peer-Review des Wissenschaftlich Beratenden Ausschusses (ESAC) des ECVAM, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Verfügbar unter: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol. 23/4, 271-283.
- (40) Publikation des ILSI (Entwurf). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, 177-183.

- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*, Vol. 49, 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the in vitro micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutation Research*, Vol. 17/3, 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, 173-215.

- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, 55-65.
- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in-vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, Umweltprogramm der Vereinten Nationen (UNEP). Verfügbar unter: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 190/3, 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooley (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, 103-112.

- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to „Report from the in vitro micronucleus assay working group“. *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, 1-3.
- (70) Surralles, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, 86-87.
- (72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, 101-107.
- (73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Auf Anfrage erhältlich.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, 32-56.
- (75) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the in vitro Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, 36-43.
- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol. 746/1, 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, 269-275.

- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, 280-286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, 355-362.
- (82) Shi, J., R. Bezabie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment Nr. 198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, 65-75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2. Auflage, John Wiley and Sons, New York
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test“, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2. Auflage. Chow, S. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc. New York, 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3. Auflage, John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, 1-175.

- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from in vitro Cytogenetic Assays, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge, 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Aneugen: Chemikalie oder Prozess, die/der durch Wechselwirkung mit den Komponenten des mitotischen und meiotischen Zellteilungszyklus-Apparats zu Aneuploidie in Zellen oder Organismen führt.

Aneuploidie: Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Apoptose: Programmierter Zelltod, der durch eine Reihe von Schritten charakterisiert ist, an deren Ende eine Desintegration von Zellen in membranumschlossene Partikel steht, die schließlich durch Phagozytose oder Shedding abgebaut werden.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Genotoxisch: Allgemeine Bezeichnung für alle Arten von DNA- oder Chromosomenschäden, einschließlich Brüchen, Deletionen, Addukten, Nukleotidmodifikationen und -verknüpfungen, Reunionen, Genmutationen, Chromosomenaberrationen und Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Kinetochor: Proteinhaltige Struktur, die sich am Zentromer eines Chromosoms sammelt, an der während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

Klastogen: Chemikalie oder Ereignis, die/das strukturelle Chromosomenaberrationen in Zellpopulationen oder eukaryontischen Organismen auslöst.

Konzentrationen: Beziehen sich auf Endkonzentrationen der Prüfchemikalie im Kulturmedium.

Interphasezellen: Zellen, die sich nicht im Stadium der Mitose befinden.

Lösungsmittelkontrolle: allgemeiner Begriff zur Bezeichnung der Kontrollkulturen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt werden, in dem die Prüfchemikalie gelöst wird.

Mikronuclei/Mikrokerne: Kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von

diesen getrennt, die während der Telophase der Mitose oder Meiose durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

Mitose: Teilung des Zellkerns, die in der Regel in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert ist.

Mitoseindex: Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Metaphase befinden; ein Hinweis auf den Grad der Zellproliferation dieser Population.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Non-Disjunktion: Unvermögen der paarweise angeordneten Chromatiden, sich zu trennen und sich auf die in Entwicklung begriffenen Tochterzellen aufzuteilen. Dabei entstehen Tochterzellen mit abweichenden Chromosomenzahlen.

p53-Status: Das p53-Protein ist an der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt. Zellen, denen ein funktionales p53-Protein fehlt und die nicht in der Lage sind, den Zellzyklus aufzuhalten oder beschädigte Zellen über Apoptose oder andere Mechanismen (z. B. Einleitung einer DNA-Reparatur) im Zusammenhang mit Aufgaben des p53-Proteins als Reaktion auf DNA-Schäden zu beseitigen, sollten theoretisch eher zu Genmutationen oder Chromosomenaberrationen neigen.

Polyploidie: Zahlenmäßige Chromosomenaberrationen in Zellen oder Organismen, von denen ein oder mehrere ganze Chromosomensätze betroffen sind, im Gegensatz zur Aneuploidie, bei der nur ein oder mehrere einzelne Chromosomen betroffen sind.

Proliferationsindex (PI): Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (Formel siehe Anlage 2).

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Relative Erhöhung der Zellzahl (RICC): Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (Formel siehe Anlage 2).

Relative Populationsverdopplung (RPD): Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (Formel siehe Anlage 2).

Replikationsindex (RI): Anteil der abgeschlossenen Zellteilungszyklen in einer behandelten Kultur im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrollgruppe während der Expositions- und Regenerationsphase (Formel siehe Anlage 2).

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und den für die metabolische

Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

S9-Leberfraktion: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren bei 9000 g, d. h. Rohleberextrakt.

Unbehandelte Kontrollen: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit einer Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch gleichzeitig in gleicher Weise aufbereitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

Zellproliferation: Zunahme der Anzahl von Zellen als Ergebnis der mitotischen Zellteilung.

Zentromer: DNA-Bereich eines Chromosoms, an dem die beiden Chromatiden zusammengehalten werden und an dem beide Kinetochoren Seite an Seite angeordnet sind.

Zytokinese: Prozess der Zellteilung unmittelbar nach der Mitose, bei dem zwei Tochterzellen, jeweils mit einem einzigen Kern, gebildet werden.

Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI): Anteil der Zellen aus zweiter Teilung in der behandelten Population im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrollgruppe (Formel siehe Anlage 2).

Zytostase: Hemmung des Zellwachstums (Formel siehe Anlage 2).

Zytotoxizität: Bei den unter diese Prüfmethode fallenden Versuchen, die mit Zusatz von Cytochalasin B durchgeführt werden, bezeichnet Zytotoxizität eine Verringerung des Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) oder Replikationsindex (RI) der behandelten Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Nummer 26 und Anlage 2).

Bei den unter diese Prüfmethode fallenden Versuche, die ohne Zusatz von Cytochalasin B durchgeführt werden, bezeichnet Zytotoxizität eine Verringerung der relativen Populationsverdopplung (RPD) bzw. der relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC) der behandelten Zellen, verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Nummer 27 und Anlage 2).

Anlage 2

FORMELN ZUR BEWERTUNG DER ZYTOTOXIZITÄT

1. Wenn cytoB zum Einsatz kommt, sollte die Bewertung der Zytotoxizität auf dem **Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI)** oder dem **Replikationsindex (RI)** beruhen (17) (69). Der CBPI gibt die mittlere Zahl der Kerne pro Zelle an und kann zur Berechnung der Zellproliferation eingesetzt werden. Der RI gibt die relative Zahl der Zellzyklen pro Zelle während der Exposition gegenüber cytoB in behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrollkulturen an und kann zur Berechnung der Zytostase in % verwendet werden:

$$\% \text{ Zytostase} = 100 - 100 \{ (\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1) \}$$

und:

T = mit der Prüfchemikalie behandelte Kultur

C = Vehikel-Kontrollkultur

Dabei gilt:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Anzahl einkerniger Zellen}) + (2 \times \text{Anzahl zweikerniger Zellen}) + (3 \times \text{Anzahl mehrkerniger Zellen}))}{(\text{Gesamtzellpopulation})}$$

Damit entspricht ein CBPI von 1 (alle Zellen sind einkernig) einer Zytostase von 100 %.

$$\text{Zytostase} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{Anzahl zweikerniger Zellen}) + (2 \times \text{Anzahl mehrkerniger Zellen})) \div (\text{Gesamtzellpopulation})_T}{((\text{Anzahl zweikerniger Zellen}) + (2 \times \text{Anzahl mehrkerniger Zellen})) \div (\text{Gesamtzellpopulation})_C} \times 100$$

T = behandelte Kulturen

C = Kontrollkulturen

2. Ein RI von 53 % bedeutet somit, dass sich in der behandelten Kultur gegenüber der Anzahl der Zellen in der Kontrollkultur, die sich geteilt und zwei- und mehrkernige Zellen gebildet haben, nur 53 % geteilt haben, was eine Zytostase von 47 % bedeutet.

3. Wenn kein cytoB zum Einsatz kommt, wird eine Bewertung der Zytotoxizität auf der Basis der **relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC)** oder der **relativen Populationsverdopplung (RPD)** empfohlen (69), da bei beiden der Anteil der Zellpopulation berücksichtigt wird, der eine Teilung durchlaufen hat.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{zahlenmäßige Zunahme von Zellen in behandelten Kulturen (Ende – Beginn)})}{(\text{zahlenmäßige Zunahme von Zellen in Kontrollkulturen (Ende – Beginn)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Anzahl von Populationsverdopplungen in behandelten Kulturen})}{(\text{Anzahl von Populationsverdopplungen in Kontrollkulturen})} \times 100$$

Dabei gilt:

$$\text{Populationsverdopplung} = [\log ((\text{Zellzahl nach Behandlung} \div \text{Anfängliche Zellzahl}))] \div \log 2$$

4. Somit zeigt eine RICC oder eine RPD von 53 % eine Zytotoxizität/Zytostase von 47 % an.
5. Bei Verwendung eines **Proliferationsindex (PI)** kann die Zytotoxizität durch das Zählen aller Klone bewertet werden, die aus 1 Zelle (cl1), 2 Zellen (cl2), 3 bis 4 Zellen (cl4) sowie 5 bis 8 Zellen (cl8) bestehen.

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

6. Der PI wurde als aussagefähiger und zuverlässiger Parameter für die Zytotoxizität auch bei Zelllinien verwendet, die in vitro ohne cytoB kultiviert wurden (35) (36) (37) (38) und kann als nützlicher zusätzlicher Parameter angesehen werden.

In jedem Fall sollen die behandelten Kulturen und die Negativkontrollkulturen vor der Behandlung die gleiche Zellzahl aufweisen.

Wenngleich der RCC-Wert (d. h. Zellzahl in behandelten Kulturen/Zellzahl in Kontrollkulturen) in der Vergangenheit als Bestimmungsgröße für die Zytotoxizität herangezogen wurde, wird er nicht mehr empfohlen, da er zu einer Unterschätzung der Toxizität führen kann.

Bei der Verwendung automatisierter Auswertungssysteme, wie Durchflusszytometrie, Laser-Scan-Zytometrie oder Bildanalyse, kann die Zellzahl in der Formel durch die Anzahl der

Kerne ersetzt werden.

In den Negativkontrollkulturen sollte die Populationsverdopplung bzw. der Replikationsindex mit den Anforderungen an die Probenahme von Zellen nach der Behandlung zu einem Zeitpunkt, der etwa der 1,5-bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht, übereinstimmen.“

(15) In Teil B werden die folgenden Kapitel angefügt:

„B.59 In-chemico-Hautsensibilisierung: Direkt-Peptidreaktivitätstest (DPRA)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 442C (2015). Ein Hautallergen ist gemäß Definition im Globalen Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN-GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP)¹ ein Stoff, der bei Hautkontakt eine allergische Reaktion auslöst. Diese Prüfmethode ist ein In-chemico-Verfahren (Direkt-Peptidreaktivitätstest – DPRA) zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren gemäß UN-GHS und CLP.
2. Es besteht allgemeines Einverständnis über die der Hautsensibilisierung zugrunde liegenden biologischen Vorgänge. Das vorhandene Wissen über die chemischen und biologischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Hautsensibilisierung wurde in Form eines Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), ausgehend von dem auslösenden molekularen Ereignis über die Zwischenvorgänge bis hin zur schädlichen Auswirkung auf die Gesundheit, nämlich die allergische Kontaktdermatitis beim Menschen oder die Kontakt-Überempfindlichkeit bei Nagetieren, zusammengefasst. Innerhalb des Hautsensibilisierungs-AOP ist das auslösende molekulare Ereignis die kovalente Bindung von elektrophilen Stoffen an nukleophile Zentren in Hautproteinen.
3. Die Bewertung der Hautsensibilisierung erfolgte normalerweise an Labortieren. Bei den klassischen Methoden an Meerschweinchen, dem Maximierungstest an Meerschweinchen (Guinea Pig Maximisation Test, GMPT) nach Magnusson/Kligman und dem Bühler-Test (Kapitel B.6 (3)), werden die Induktions- und die Auslösephase der Hautsensibilisierung untersucht. Ein Test an der Maus, der Lokale Lymphknotentest (LLNA, Kapitel B.42 (4)) und die beiden nicht radioaktiven Abwandlungen dieses Tests, LLNA: DA (Kapitel B.50 (5)) und LLNA: BrdU-ELISA (Kapitel B.51 (6)), bei denen jeweils nur die

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1.

Induktionsreaktion bewertet wird, haben ebenfalls an Akzeptanz gewonnen, da sie sowohl in Bezug auf den Tierschutz als auch die objektive Messung der Induktionsphase der Hautsensibilisierung Vorteile gegenüber Tests am Meerschweinchen bieten.

4. Vor kurzem wurden mechanistisch basierte In-chemico- und In-vitro-Prüfmethoden für die Bewertung der Gefahr einer Hautsensibilisierung durch Chemikalien als wissenschaftlich fundiert befunden. Allerdings sind Methoden ohne Tierversuche (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) im Rahmen von integrierten Test- und Bewertungsansätzen (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) erforderlich, um die gegenwärtig angewandten Tierversuche angesichts der eingeschränkten mechanistischen AOP-Abdeckung der gegenwärtig verfügbaren Prüfmethoden ohne Tierversuche zu ersetzen (2) (7).
5. Der DPRA wird für das auslösende molekulare Ereignis im AOP der Hautsensibilisierung, nämlich die Proteinreaktivität, vorgeschlagen, indem die Reaktivität von Prüfchemikalien gegenüber synthetischen lysin- oder cysteinhaltigen Modellpeptiden quantifiziert wird (8). Anhand der prozentualen Peptid-Depletionswerte für Cystein und Lysin wird ein Stoff dann in eine von vier Reaktivitätsklassen eingestuft, um die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren zu unterstützen (9).
6. Der DPRA wurde in einer Validierungsstudie unter der Leitung eines Europäischen Referenzlabors für Alternativen zu Tierversuchen (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, EURL ECVAM) und in einem anschließenden unabhängigen Peer-Review des Wissenschaftlich Beratenden Ausschusses (ESAC) des EURL ECVAM bewertet und aus wissenschaftlicher Sicht für zulässig befunden (10), um im Rahmen eines IATA die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren im Hinblick auf die Gefahreinstufung und -kennzeichnung zu unterstützen. Beispiele für die Verwendung von DPRA-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (11) (12) (13) (14).
7. Definitionen sind Anlage I zu entnehmen.

VORBEMERKUNGEN, ANWENDBARKEIT UND EINSATZGRENZEN

8. Die Korrelation zwischen Proteinreaktivität und Hautsensibilisierungspotenzial ist gut nachgewiesen (15) (16) (17). Da die Proteinbindung jedoch nur einen einzigen Schlüsselvorgang, wenn auch das auslösende molekulare Ereignis für den AOP der Hautsensibilisierung, darstellt, reichen die mit Prüfmethoden und Nicht-Prüfmethoden ermittelten Informationen alleine möglicherweise nicht aus, um zu dem Schluss zu gelangen, dass Chemikalien kein Hautsensibilisierungspotenzial besitzen. Daher sollten die mit dieser Prüfmethode ermittelten Daten im Rahmen integrierter Ansätze, wie z. B. IATA, betrachtet und mit anderen ergänzenden Informationen, die beispielsweise aus In-vitro-Tests in Bezug auf andere Schlüsselvorgänge des Hautsensibilisierungs-AOP

abgeleitet werden, sowie mit anderen Nicht-Prüfmethoden, einschließlich der Übertragung von Informationen (*read across*) zu chemischen Analoga, kombiniert werden.

9. Diese Prüfmethode kann zusammen mit anderen ergänzenden Informationen zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP-Kategorie 1) und Nichtsensibilisatoren im Rahmen eines IATA eingesetzt werden. Diese Prüfmethode kann alleine weder zur Einstufung von Hautallergenen in die Unterkategorien 1A und 1B gemäß Definition in UN-GHS/CLP noch zur Vorhersage des Potenzials im Rahmen von Sicherheitsbewertungsentscheidungen verwendet werden. Jedoch kann ein positives Ergebnis mit dem DPRA je nach Rechtsrahmen alleine zur Einstufung einer Chemikalie in die UN-GHS/CLP-Kategorie 1 herangezogen werden.
10. Es hat sich gezeigt, dass die DPRA-Prüfmethode Labors mit Erfahrung auf dem Gebiet der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) übertragen werden kann. Der Grad der Reproduzierbarkeit bei Vorhersagen, der bei der Prüfmethode erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 85 % innerhalb von Labors und von 80 % zwischen Labors (10). Die Ergebnisse der Validierungsstudie (18) und veröffentlichter Studien (19) weisen insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit des DPRA bei der Unterscheidung von Sensibilisatoren (d. h. UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) gegenüber Nichtsensibilisatoren 80 % (N = 157) bei einer Empfindlichkeit von 80 % (88/109) und einer Spezifität von 77 % (37/48) im Vergleich zu den Ergebnissen des LLNA beträgt. Beim DPRA ist die Wahrscheinlichkeit einer Unterschätzung bei Chemikalien mit geringem bis mittlerem Hautsensibilisierungspotenzial (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B) größer als bei Chemikalien mit hohem Hautsensibilisierungspotenzial (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (18) (19). Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für den DPRA als eigenständige Testmethode angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da die Prüfmethode in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 9 betrachtet werden sollte. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Prüfmethoden zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA-Test sowie andere Tierversuche die Situation bei den relevanten Arten, d. h. Menschen, nicht vollständig widerspiegeln. Auf der Grundlage der verfügbaren Gesamtdaten über den DPRA wurde nachgewiesen, dass der Test bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen funktionellen Gruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzialen (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (8) (9) (10) (19). Insgesamt deuten diese Informationen auf die Zweckmäßigkeit des DPRA für die Erkennung der Gefahr einer Hautsensibilisierung hin.
11. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was getestet wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit des DPRA für die Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen. Diese Prüfmethode ist nicht für die Untersuchung von

Metallverbindungen geeignet, da diese bekanntermaßen mit Proteinen reagieren, die über andere Mechanismen als die kovalente Bindung wirken. Eine Prüfchemikalie sollte in einem geeigneten Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 100 mM löslich sein (siehe Nummer 18). Prüfchemikalien, die in dieser Konzentration nicht löslich sind, können unter Umständen jedoch trotzdem in geringeren löslichen Konzentrationen getestet werden. In einem solchen Fall könnte ein positives Ergebnis dennoch zur Identifizierung der Prüfchemikalie als Hautallergen unterstützend herangezogen werden, während bei einem negativen Ergebnis keine verbindlichen Rückschlüsse auf die fehlende Reaktivität gezogen werden dürfen. Gegenwärtig stehen nur begrenzte Informationen über die Anwendbarkeit des DPRA auf Gemische mit bekannter Zusammensetzung zur Verfügung (18) (19). Dennoch gilt der DPRA für die Prüfung von mehrkomponentigen Substanzen und Gemischen mit bekannter Zusammensetzung als technisch geeignet (siehe Nummer 18). Bevor diese Prüfmethode auf ein Gemisch angewendet wird, um zu Regulierungszwecken Daten zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum, sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist. Das gegenwärtige Vorhersagemodell kann aufgrund des festgelegten Molverhältnisses von Prüfchemikalie und Peptid nicht bei komplexen Gemischen mit unbekannter Zusammensetzung oder bei Stoffen mit unbekannter oder variabler Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (z. B. UVCB-Stoffen) eingesetzt werden. Für diesen Zweck wird es erforderlich sein, ein neues Vorhersagemodell auf der Grundlage eines gravimetrischen Ansatzes zu entwickeln. Wenn nachgewiesen werden kann, dass die Prüfmethode bei anderen spezifischen Chemikalienkategorien nicht anwendbar ist, sollte sie bei diesen nicht verwendet werden.

12. Diese Prüfmethode ist eine In-chemico-Methode, die kein Stoffwechselsystem beinhaltet. Chemikalien, die ihr Hautsensibilisierungspotenzial erst durch eine enzymatische Bioaktivierung erlangen (d. h. Prohaptene), können mit dieser Prüfmethode nicht erkannt werden. Chemikalien, die erst nach einer abiotischen Umwandlung zu Sensibilisatoren werden (d. h. Prähaptene), werden Berichten zufolge in einigen Fällen mit der Prüfmethode richtig erkannt (18). Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten mit der Prüfmethode erhaltene negative Ergebnisse im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA interpretiert werden. Prüfchemikalien, die nicht kovalent an das Peptid binden, sondern seine Oxidation (d. h. Cystein-Dimerisierung) fördern, könnten zu einer potenziellen Überschätzung der Peptid-Depletion führen, mit der Folge möglicher falscher Positiv-Vorhersagen und/oder einer Einstufung in eine höhere Reaktivitätsklasse (siehe Nummern 29 und 30).
13. Der DPRA unterstützt, wie bereits erwähnt, die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Er kann jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen (11). Es sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, vorzugsweise auf

der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse des DPRA möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.

TESTPRINZIP

14. Der DPRA ist eine In-chemico-Methode, bei der die Restkonzentration eines cystein- oder lysinhaltigen Peptids nach 24-stündiger Inkubation mit der Prüfchemikalie bei $25 \pm 2,5$ °C quantifiziert wird. Die synthetischen Peptide enthalten Phenylalanin als Hilfsmittel zum Nachweis. Die relative Peptidkonzentration wird mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Gradientenelution und UV-Detektion bei 220 nm gemessen. Anschließend werden die prozentualen Peptid-Depletionswerte für Cystein und Lysin berechnet, die als Eingangsparameter in ein Vorhersagemodell (siehe Nummer 29) zur Einstufung der Prüfchemikalie in eine von vier Reaktivitätsklassen einfließen, die zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilatoren verwendet werden.
15. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Prüfmethode beschriebenen Verfahrens sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 2 aufgeführten Leistungsstoffe nachweisen.

VERFAHREN

16. Diese Prüfmethode basiert auf dem DPRA DB-ALM-Protokoll Nr. 154 (20), das für die vom EURL ECVAM koordinierte Validierungsstudie verwendet wurde. Es wird empfohlen, dieses Protokoll bei der Durchführung und Anwendung der Methode im Labor zugrunde zu legen. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren des DPRA beschrieben. Bei der Verwendung eines anderen HPLC-Aufbaus ist dessen Gleichwertigkeit mit dem im DB-ALM-Protokoll beschriebenen validierten Aufbau nachzuweisen (z. B. durch Prüfung der Leistungsstoffe in Anlage 2).

Vorbereitung der cystein- oder lysinhaltigen Peptide

17. Die Stammlösungen von cysteinhaltigen (Ac-RFAACAA-COOH) und lysinhaltigen (Ac-RFAAKAA-COOH) synthetischen Peptiden mit einer Reinheit von mehr als 85 % (vorzugsweise im Bereich von 90-95 %) sollten kurz vor ihrer Inkubation mit der Prüfchemikalie frisch zubereitet werden. Die Endkonzentration des Cysteinpeptids sollte 0,667 mM in einem Phosphatpuffer mit pH 7,5 und die Endkonzentration des Lysinpeptids 0,667 mM in einem Ammoniumacetat-Puffer mit pH 10,2 betragen. Die HPLC-Sequenz ist so einzustellen, dass die HPLC-Analyse in weniger als 30 Stunden abgeschlossen ist. Bei dem in der Validierungsstudie verwendeten und in dieser Prüfmethode beschriebenen HPLC-Aufbau können in einem einzigen HPLC-Durchlauf bis zu 26 Analyseproben

(bestehend aus der Prüfchemikalie, der Positivkontrolle und einer entsprechenden Anzahl an Lösungsmittelkontrollen, abhängig von der Anzahl der einzelnen im Test verwendeten Lösungsmittel, jeweils dreifach getestet) abgearbeitet werden. Alle im gleichen Durchlauf analysierten Replikate sollten die gleichen Cystein- und Lysinpeptid-Stammlösungen verwenden. Es wird empfohlen, vor der Verwendung der einzelnen Peptidchargen ihre Löslichkeit entsprechend nachzuweisen.

Vorbereitung der Prüfchemikalie

18. Vor der Durchführung des Tests sollte die Löslichkeit der Prüfchemikalie in einem geeigneten Lösungsmittel gemäß dem im DPRA DB-ALM-Protokoll (20) beschriebenen Solubilisierungsverfahren bewertet werden. Ein geeignetes Lösungsmittel löst die Prüfchemikalie vollständig auf. Da die Prüfchemikalie beim DPRA mit hohem Überschuss mit den Cystein- oder den Lysinpeptiden inkubiert wird, gilt die visuelle Prüfung auf Bildung einer klaren Lösung als ausreichend, um festzustellen, dass die Prüfchemikalie (und – bei Testung einer mehrkomponentigen Substanz oder eines Gemischs – alle Bestandteile) aufgelöst wurde(n). Geeignete Lösungsmittel sind Acetonitril, Wasser, ein 1:1-Gemisch aus Wasser und Acetonitril, Isopropanol, Aceton oder ein 1:1-Gemisch aus Aceton und Acetonitril. Andere Lösungsmittel können verwendet werden, solange sie die Stabilität des Peptids nicht beeinträchtigen. Dies wird mithilfe von Referenzkontrollen C (d. h. Proben, bei denen das Peptid alleine im jeweiligen Lösungsmittel aufgelöst ist; siehe Anlage 3) überwacht. Ist die Prüfchemikalie in keinem dieser Lösungsmittel löslich, sollte als letzte Möglichkeit versucht werden, sie in 300 µL DMSO zu lösen und die erhaltene Lösung mit 2700 µL Acetonitril zu verdünnen. Ist die Prüfchemikalie auch in diesem Gemisch unlöslich, sollte versucht werden, sie in gleicher Menge in 1500 µL DMSO zu lösen und die erhaltene Lösung mit 1500 µL Acetonitril zu verdünnen. Zum Ansetzen einer 100-mM-Lösung wird die Prüfchemikalie vorgewogen in Glasgefäße gegeben und unmittelbar vor dem Test in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelöst. Bei Gemischen und mehrkomponentigen Substanzen mit bekannter Zusammensetzung wird aus der Summe der Anteile der einzelnen Bestandteile (ausgenommen Wasser) ein einziger Wert für die Reinheit und anhand der Molekulargewichte der einzelnen Bestandteile im Gemisch (ausgenommen Wasser) und ihres jeweiligen Anteils ein einziges scheinbares Molekulargewicht bestimmt. Aus den erhaltenen Werten für die Reinheit und das scheinbare Molekulargewicht wird dann das erforderliche Gewicht der Prüfchemikalie für die Zubereitung einer 100-mM-Lösung berechnet. Bei Polymeren, für die sich kein vorherrschendes Molekulargewicht bestimmen lässt, kann das Molekulargewicht des Monomers (oder das scheinbare Molekulargewicht der verschiedenen Monomere, aus denen sich das Polymer zusammensetzt) für die Zubereitung einer 100-mM-Lösung herangezogen werden. Bei der Prüfung von Gemischen, mehrkomponentigen Substanzen oder Polymeren mit bekannter Zusammensetzung sollte jedoch auch in Erwägung gezogen werden, die unverdünnte Chemikalie zu testen. Bei Flüssigkeiten wird die unverdünnte

Chemikalie so, wie sie ist, ohne vorherige Verdünnung getestet und in einem molaren Verhältnis von 1:10 und 1:50 mit den Cystein- bzw. Lysinpeptiden inkubiert. Bei festen Stoffen wird die Prüfchemikalie auf ihre höchste lösliche Konzentration in dem gleichen Lösungsmittel aufgelöst, das zum Ansetzen der scheinbaren 100-mM-Lösung verwendet wurde. Anschließend wird sie so, wie sie ist, ohne weitere Verdünnung getestet und in einem molaren Verhältnis von 1:10 und 1:50 mit den Cystein- bzw. Lysinpeptiden inkubiert. Übereinstimmende Ergebnisse (reaktiv oder nicht reaktiv) zwischen der scheinbaren 100-mM-Lösung und der unverdünnten Chemikalie sollten eine verbindliche Schlussfolgerung bezüglich des Ergebnisses zulassen.

Vorbereitung der Positivkontrolle, Referenzkontrollen und Koelutionskontrollen

19. Als Positivkontrolle (PC) sollte Zimtaldehyd (CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ von lebensmitteltauglicher Reinheit) mit einer Konzentration von 100 mM in Acetonitril verwendet werden. Andere geeignete Positivkontrollen, die vorzugsweise Depletionswerte im mittleren Bereich ergeben, können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Außerdem sollte die HPLC-Sequenz auch Referenzkontrollen (d. h. Proben, die nur das im entsprechenden Lösungsmittel gelöste Peptid enthalten) umfassen. Diese dienen dazu, die Eignung des HPLC-Systems vor der Analyse (Referenzkontrollen A) und die Stabilität der Referenzkontrollen im Zeitverlauf (Referenzkontrollen B) zu verifizieren und zu bestätigen, dass das zur Lösung der Prüfchemikalie verwendete Lösungsmittel die prozentuale Peptid-Depletion nicht beeinflusst (Referenzkontrollen C) (siehe Anlage 3). Mithilfe der geeigneten Referenzkontrolle für jede Chemikalie wird die prozentuale Peptid-Depletion für diese Chemikalie berechnet (siehe Nummer 26). Darüber hinaus sollte für jede analysierte Prüfchemikalie eine Koelutionskontrolle, bestehend aus der Prüfchemikalie alleine, in die Ablaufsequenz aufgenommen werden, um eine mögliche Koelution der Prüfchemikalie mit dem Lysinpeptid bzw. dem Cysteinpeptid zu erkennen.

Inkubation der Prüfchemikalie mit den Cystein- und Lysinpeptid-Lösungen

20. Die Cystein- und Lysinpeptid-Lösungen sollten in Autosampler-Glasgefäßen in einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:50 mit der Prüfchemikalie inkubiert werden. Wenn es unmittelbar nach der Zugabe der Prüfchemikalie zur Peptidlösung aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Prüfchemikalie zu einer Ausfällung kommt, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, welche Menge der Prüfchemikalie in der Lösung verblieben ist, um mit dem Peptid zu reagieren. In diesem Fall könnte ein positives Ergebnis trotzdem verwendet werden. Ein negatives Ergebnis ist hingegen unsicher und sollte entsprechend vorsichtig interpretiert werden (siehe auch die Vorschriften unter Nummer 11 für die Prüfung von Chemikalien, die bis zu einer Konzentration von 100 mM unlöslich sind). Die Reaktionslösung wird bei $25 \pm 2,5\text{ }^\circ\text{C}$ 24 ± 2 Stunden vor der Durchführung der HPLC-Analyse im Dunkeln gelassen. Jede Prüfchemikalie wird für beide Peptide in dreifacher

Ausfertigung analysiert. Die Proben sind vor der HPLC einer Sichtprüfung zu unterziehen. Bei festgestellter Ausfällung oder Phasentrennung können die Proben als Vorsichtsmaßnahme bei geringer Geschwindigkeit (100-400 x g) zentrifugiert werden, damit die Ausfällung auf den Boden des Gefäßes sinkt, da große Ausfällungsmengen die Leitungen oder Säulen der HPLC-Apparatur verstopfen können. Wird nach der Inkubationszeit eine Ausfällung oder Phasentrennung festgestellt, kann die Peptid-Depletion unterschätzt werden. In diesem Fall kann bei einem negativen Ergebnis nicht mit hinreichender Sicherheit auf das Fehlen von Reaktivität geschlossen werden.

Erstellung der HPLC-Standardkalibrierungskurve

21. Sowohl für die Cystein- als auch die Lysinpeptide sollte eine Standardkalibrierungskurve erstellt werden. Die Peptidstandards werden in einer Lösung mit 20 % oder 25 % Acetonitril/Puffer unter Verwendung eines Phosphatpuffers (pH 7,5) für das Cysteinpeptid und eines Ammoniumacetat-Puffers (pH 10,2) für das Lysinpeptid zubereitet. Aus Verdünnungsreihen-Standards der Peptid-Stammlösung (0,667 mM) werden sechs Kalibrierungslösungen hergestellt, die den Bereich von 0,534 bis 0,0167 mM abdecken. Eine Blindkontrolle des Verdünnungspuffers sollte ebenfalls in die Standardkalibrierungskurve aufgenommen werden. Geeignete Kalibrierungskurven sollten einen Wert von $r^2 > 0,99$ aufweisen.

Vorbereitung des HPLC-Systems und Analyse

22. Vor der Durchführung der Analyse ist die Eignung des HPLC-Systems zu verifizieren. Die Peptid-Depletion wird durch ein mit einem UV-Detektor (Fotodiodenarray-Detektor oder Festwellenlängen-Absorptionsdektektor mit 220-nm-Signal) verbundenes HPLC-Gerät überwacht. Die entsprechende Säule wird in das HPLC-System eingebaut. Bei dem im validierten Protokoll beschriebenen HPLC-Aufbau wird das Modell Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 µm als bevorzugte Säule verwendet. Bei dieser Säule für die Umkehrphasen-HPLC sollte das gesamte System mindestens 2 Stunden vor dem Betrieb bei 30 °C mit 50 % Phase A (0,1 % v/v Trichloressigsäure in Wasser) und 50 % Phase B (0,085 % v/v Trichloressigsäure in Acetonitril) äquilibriert werden. Die HPLC-Analyse erfolgt mit einer Flussrate von 0,35 ml/min und einem linearen Gradienten von 10 % bis 25 % Acetonitril über einen Zeitraum von 10 Minuten, gefolgt von einem schnellen Anstieg auf 90 % Acetonitril, um andere Materialien zu entfernen. Standard, Probe und Kontrolle werden jeweils in gleicher Menge injiziert. Zwischen den Injektionen wird die Säule unter den Ausgangsbedingungen 7 Minuten lang neu äquilibriert. Bei Verwendung einer anderen Säule für die Umkehrphasen-HPLC müssen die oben genannten Einstellparameter möglicherweise angepasst werden, um eine angemessene Elution und Integration der Cystein- und Lysinpeptide sicherzustellen. Dies gilt auch für die Injektionsmenge, die je nach verwendetem System variieren kann (normalerweise im Bereich von 3-10 µl). Wichtig ist auch, dass bei der Verwendung eines anderen Aufbaus

der HPLC-Apparatur dessen Gleichwertigkeit mit dem vorstehend beschriebenen validierten Aufbau nachgewiesen wird (z. B. durch Prüfung der Leistungsstoffe in Anlage 2). Die Extinktion wird bei 220 nm überwacht. Bei Verwendung eines Fotodiodenarray-Detektors sollte die Extinktion bei 258 nm ebenfalls aufgezeichnet werden. Es wird darauf hingewiesen, dass einige Acetonitril-Chargen die Peptidstabilität beeinträchtigen können. Dies muss bei der Verwendung einer neuen Acetonitril-Charge bewertet werden. Als Indikator für eine Koelution kann das Verhältnis der Peakfläche bei 220 nm und der Peakfläche bei 258 nm verwendet werden. Beispielsweise wäre bei jeder Probe ein Verhältnis im Bereich von $90\% < \text{mittleres}^1$ Flächenverhältnis der Kontrollproben $< 100\%$ ein guter Anhaltspunkt dafür, dass keine Koelution eingetreten ist.

23. Es gibt unter Umständen Prüfchemikalien, die die Oxidation des Cysteinpeptids fördern könnten. Der Peak des dimerisierten Cysteinpeptids kann visuell überwacht werden. Scheint eine Dimerisierung erfolgt zu sein, sollte dies vermerkt werden, da die prozentuale Peptid-Depletion überschätzt werden kann, was zu falschen Positiv-Vorhersagen und/oder einer Einstufung in eine höhere Reaktivitätsklasse führen kann (siehe Nummer 29 und 30).
24. Die HPLC-Analyse der Cystein- und Lysinpeptide kann gleichzeitig (wenn zwei HPLC-Systeme zur Verfügung stehen) oder an verschiedenen Tagen durchgeführt werden. Erfolgt die Analyse an verschiedenen Tagen, sind alle Prüfchemikalienlösungen für beide Tests am jeweiligen Tag frisch herzustellen. Die Analyse wird zeitlich so angesetzt, dass die Injektion der ersten Probe 22 bis 26 Stunden nach Mischung der Prüfchemikalie mit der Peptidlösung stattfindet. Die HPLC-Sequenz ist so einzustellen, dass die HPLC-Analyse in weniger als 30 Stunden abgeschlossen ist. Bei dem in der Validierungsstudie verwendeten und bei dieser Prüfmethode beschriebenen HPLC-Aufbau können in einem einzigen HPLC-Durchlauf bis zu 26 Analyseproben abgearbeitet werden (siehe auch Nummer 17). Ein Beispiel für eine HPLC-Analysesequenz ist Anlage 3 zu entnehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

25. Die Konzentration des Cystein- oder Lysinpeptids der einzelnen Proben wird bei 220 nm fotometrisch bestimmt. Hierzu wird die Peakfläche (Fläche unter der Kurve (*Area Under*

¹ Unter dem Begriff „Mittelwert“ oder „mittlere/r/s“ ist im gesamten Dokument das arithmetische Mittel zu verstehen.

the Curve, AUC) der entsprechenden Peaks gemessen, und anhand der aus den Standards abgeleiteten linearen Kalibrierungskurve wird die Peptidkonzentration berechnet.

26. Die prozentuale Peptid-Depletion der einzelnen Proben erhält man nach folgender Formel durch Messung der Peakfläche und deren Division durch die mittlere Peakfläche der jeweiligen Referenzkontrollen C (siehe Anlage 3)

$$\text{Prozentuale Peptiddepletion} = \left[1 - \left(\frac{\text{Peptid - Peakfläche bei Replikatinjektion}}{\text{Mittelwert der Peptid- Peakfläche bei Referenzkontrollen C}} \right) \right] \times 100$$

Akzeptanzkriterien

27. Ein Testdurchlauf gilt als gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- a) Die Standardkalibrierungskurve weist einen Wert von $r^2 > 0,99$ auf;
- b) der Mittelwert der prozentualen Peptid-Depletion der drei Replikate für die Positivkontrolle mit Zimtaldehyd liegt zwischen 60,8 % und 100 % beim Cysteinpeptid und zwischen 40,2 % und 69,0 % beim Lysinpeptid, und die maximale Standardabweichung (SA) für die Replikate der Positivkontrolle beträgt $< 14,9$ % für die prozentuale Cystein-Depletion und $< 11,6$ % für die prozentuale Lysin-Depletion; und
- c) die mittlere Peptidkonzentration der Referenzkontrollen A beträgt $0,50 \pm 0,05$ mM, und der Variationskoeffizient (VK) der Peptid-Peakflächen für die neun Referenzkontrollen B und C in Acetonitril beträgt $< 15,0$ %.

Wenn eines oder mehrere dieser Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Testdurchlauf zu wiederholen.

28. Die Ergebnisse für eine Prüfchemikalie gelten als gültig, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- a) Die maximale Standardabweichung bei den Replikaten der Prüfchemikalie beträgt $< 14,9$ % für die prozentuale Cystein-Depletion und $< 11,6$ % für die prozentuale Lysin-Depletion;
- b) die mittlere Peptidkonzentration der drei Referenzkontrollen C im entsprechenden Lösungsmittel beträgt $0,50 \pm 0,05$ mM. Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, werden die Daten verworfen, und der Testdurchlauf für diese spezifische Prüfchemikalie ist zu wiederholen.

Vorhersagemodell

29. Für jede Prüfchemikalie wird der Mittelwert der prozentualen Cystein- und Lysin-Depletion berechnet. Eine negative Depletion wird bei der Berechnung des Mittelwerts mit „0“ angenommen. Unter Verwendung des Vorhersagemodells Cystein 1:10/Lysin 1:50 in Tabelle 1 wird eine durchschnittliche Peptid-Depletion von 6,38 % als Schwelle zur Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren im Rahmen eines IATA herangezogen. Die Anwendung des Vorhersagemodells für die Einstufung einer Prüfchemikalie in eine Reaktivitätsklasse (d. h. geringe, mittlere und hohe Reaktivität) kann ggf. als nützliche Information für die Potenzbewertung im Rahmen eines IATA dienen.

Tabelle 1: Vorhersagemodell Cystein 1:10/Lysin 1:50¹

Mittelwert der prozentualen Cystein- und Lysin-Depletion	Reaktivitätsklasse	DPRA-Vorhersage ²
0 % ≤ Mittelwert der prozentualen Depletion ≤ 6,38 %	keine oder minimale Reaktivität	negativ
6,38 % < Mittelwert der prozentualen Depletion ≤ 22,62 %	geringe Reaktivität	positiv
22,62 % < Mittelwert der prozentualen Depletion ≤ 42,47 %	mittlere Reaktivität	
42,47 % < Mittelwert der prozentualen Depletion ≤ 100 %	hohe Reaktivität	

¹ Die Werte beziehen sich auf statistisch generierte Schwellenwerte und nicht auf die Genauigkeit der Messung.

² Eine DPRA-Vorhersage ist im Rahmen eines IATA und gemäß den Bestimmungen unter den Nummern 9 und 12 zu betrachten.

30. Es könnte Fälle geben, in denen die Prüfchemikalie (der Stoff oder einer oder mehrere Bestandteile einer mehrkomponentigen Substanz oder eines Gemischs) eine starke Extinktion bei 220 nm aufweist und die gleiche Retentionszeit wie das Peptid besitzt (Koelution). Eine Koelution kann vermieden werden, indem der HPLC-Aufbau so verändert wird, dass die Elutionszeit der Prüfchemikalie und des Peptids weiter auseinander liegen. Wird ein anderer HPLC-Aufbau verwendet, um eine Koelution aufzulösen, so ist seine Gleichwertigkeit mit dem validierten Aufbau nachzuweisen (z. B. durch Prüfung der Leistungsstoffe in Anlage 2). Bei Vorliegen einer Koelution kann der Peak des Peptids nicht integriert und die prozentuale Peptid-Depletion nicht berechnet werden. Koelutieren solche Prüfchemikalien sowohl mit den Cystein- als auch den Lysinpeptiden, ist die Analyse als „nicht aussagekräftig“ anzugeben. Liegt eine Koelution nur mit dem Lysinpeptid vor, kann das Vorhersagemodell Cystein 1:10 in Tabelle 2 verwendet werden.

Tabelle 2: Vorhersagemodell Cystein 1:10¹

Prozentuale Cystein-Depletion	Reaktivitätsklasse	DPRA-Vorhersage ²
0 % ≤ prozentuale Cystein-Depletion ≤ 13,89 %	keine oder minimale Reaktivität	negativ
13,89 % < prozentuale Cystein-Depletion ≤ 23,09 %	geringe Reaktivität	positiv
23,09 % < prozentuale Cystein-Depletion ≤ 98,24 %	mittlere Reaktivität	
98,24 % < prozentuale Cystein-Depletion ≤ 100 %	hohe Reaktivität	

1 Die Werte beziehen sich auf statistisch generierte Schwellenwerte und nicht auf die Genauigkeit der Messung.

2 Eine DPRA-Vorhersage ist im Rahmen eines IATA und gemäß den Bestimmungen unter den Nummern 9 und 12 zu betrachten.

31. Es könnte andere Fälle geben, in denen sich die Retentionszeiten der Prüfchemikalie und eines der beiden Peptide nicht vollständig überlappen. In solchen Fällen können die Peptid-Depletionswerte geschätzt und im Vorhersagemodell Cystein 1:10/Lysin 1:50 verwendet werden. Eine genaue Einstufung der Prüfchemikalie in eine Reaktivitätsklasse ist jedoch nicht möglich.
32. Bei einem eindeutigen Ergebnis ist eine einzige HPLC-Analyse sowohl für das Cystein- als auch das Lysinpeptid pro Prüfchemikalie ausreichend. Liegen die Ergebnisse jedoch nahe an der Schwelle zur Unterscheidung zwischen positivem und negativem Ergebnis (d. h. handelt es sich um grenzwertige Ergebnisse), sind möglicherweise weitere Tests erforderlich. Fällt der Mittelwert der prozentualen Depletion in den Bereich von 3 % bis 10 % (Vorhersagemodell Cystin 1:10/Lysin 1:50) bzw. die prozentuale Cystein-Depletion in den Bereich von 9 % bis 17 % (Vorhersagemodell Cystin 1:10), sind ein zweiter Testdurchlauf sowie ein dritter Durchlauf (bei abweichenden Ergebnissen zwischen den ersten beiden Durchläufen) in Erwägung zu ziehen.

Prüfbericht

33. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie

- Einkomponentige Substanz
 - chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
 - Aussehen, Wasserlöslichkeit, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
 - Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

- Behandlung vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
 - geprüfte Konzentration(en);
 - Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.
- Mehrkomponentige Substanz, UVCB-Stoffe und Gemische:
 - Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;
 - Aussehen, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
 - Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;
 - Behandlung vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
 - geprüfte Konzentration(en);
 - Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Kontrollen

- Positivkontrolle
 - Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
 - Aussehen, Wasserlöslichkeit, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
 - Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
 - Behandlung vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
 - geprüfte Konzentration(en);
 - Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
 - ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf dokumentieren.
- Lösungsmittel/Vehikel

- Verwendetes Lösungsmittel/Vehikel und ggf. das Verhältnis ihrer Bestandteile;
- chemische Bezeichnung(en), wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n) und/oder andere Kennungen;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Aussehen, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern andere Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfmethode genannten verwendet werden und soweit verfügbar;
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie;
- bei Acetonitril die Ergebnisse des Tests der Auswirkung auf die Peptidstabilität.

Vorbereitung von Peptiden, Positivkontrolle und Prüfchemikalie

- Charakterisierung der Peptidlösungen (Lieferant, Los, genaues Peptidgewicht, hinzugefügte Menge für die Stammlösung);
- Charakterisierung der Positivkontrolllösung (genaues Gewicht des für die Positivkontrolle verwendeten Stoffs, hinzugefügte Menge für die Testlösung);
- Charakterisierung der Prüfchemikalienlösungen (genaues Gewicht der Prüfchemikalien, hinzugefügte Menge für die Testlösung);

Einstellung des HPLC-Geräts und Analyse

- Typ des HPLC-Geräts, HPLC und Vorsäulen, Detektor, Autosampler;
- für die HPLC-Analyse relevante Parameter, wie Temperatur der Säule, Injektionsvolumen, Flussrate und Gradient.

Eignung des Systems

- Peptid-Peakfläche bei 220 nm jedes Replikats der Standard- und Referenzkontrolle A;
- grafische Darstellung der linearen Kalibrierungskurve und Angabe des r^2 -Wertes;
- Peptidkonzentration jedes Replikats der Referenzkontrolle A;
- mittlere Peptidkonzentration (mM) der drei Referenzkontrollen A, Standardabweichung und Variationskoeffizient;

- Peptidkonzentration der Referenzkontrollen A und C.

Ablauf der Analyse

- Für Referenzkontrollen:
 - Peptid-Peakfläche bei 220 nm jedes B- und C-Replikats;
 - mittlere Peptid-Peakfläche bei 220 nm der neun Referenzkontrollen B und C in Acetonitril, Standardabweichung und Variationskoeffizient (für die Stabilität der Referenzkontrollen über die Analysezeit);
 - für jedes verwendete Lösungsmittel: mittlere Peptid-Peakfläche bei 220 nm der drei entsprechenden Referenzkontrollen C (zur Berechnung der prozentualen Peptid-Depletion);
 - für jedes verwendete Lösungsmittel: die Peptidkonzentration (mM) der drei entsprechenden Referenzkontrollen C;
 - für jedes verwendete Lösungsmittel: die mittlere Peptidkonzentration (mM) der drei entsprechenden Referenzkontrollen C, Standardabweichung und Variationskoeffizient.
- Für die Positivkontrolle:
 - Peptid-Peakfläche bei 220 nm jedes Replikats;
 - prozentuale Peptid-Depletion jedes Replikats;
 - Mittelwert der prozentualen Peptid-Depletion der drei Replikate, Standardabweichung und Variationskoeffizient.
- Für jede Prüfchemikalie:
 - Aussehen der Ausfällung im Reaktionsgemisch am Ende der Inkubationszeit, sofern beobachtet. Angabe, ob die Ausfällung wieder löslich gemacht oder zentrifugiert wurde;
 - Auftreten von Koelution;
 - ggf. Beschreibung anderer relevanter Beobachtungen;
 - Peptid-Peakfläche bei 220 nm jedes Replikats;
 - prozentuale Peptid-Depletion jedes Replikats;
 - Mittelwert der prozentualen Peptid-Depletion der drei Replikate, Standardabweichung und Variationskoeffizient;

- Mittelwert der prozentualen Cystein- und Lysin-Depletion;
- verwendetes Vorhersagemodell und DPRA-Vorhersage.

Leistungstests

- Ggf. das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung der Prüfmethode (z. B. durch Prüfung der Leistungsstoffe) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung der Prüfmethode im Zeitverlauf.

Erörterung der Ergebnisse

- Erörterung der anhand der DPRA-Prüfmethode erhaltenen Ergebnisse;
- Erörterung der Ergebnisse der Prüfmethode im Rahmen eines IATA, sofern andere sachdienliche Informationen verfügbar sind.

Schlussfolgerung

LITERATURHINWEISE

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 5. überarbeitete Auflage, UN New York und Genf, 2013. Verfügbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment, Nr. 168, OECD, Paris.
- (3) Kapitel B.6: Sensibilisierung der Haut
- (4) Kapitel B.42: Lokaler Lymphknotentest
- (5) Kapitel B.50: Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest: DA.
- (6) Kapitel B.51: Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest BrdU-ELISA
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology, 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences, 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences, 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Verfügbar unter: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, Online-Veröffentlichung, 14. Mai 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 63: 489-504.

- (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in Vitro*, 27:609-618.
- (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 60:389-400.
- (15) Landsteiner und Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine*, 64:625-639.
- (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York und Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report, 74pp. Verfügbar unter: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
- (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, Online-Veröffentlichung, 9. April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protokoll 154. Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing, 17pp. Verfügbar unter: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Series on Testing and Assessment, Nr. 34. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris, Frankreich.
- (22) FDA (Food and Drug Administration) (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 22pp. Verfügbar unter: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf - 138
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (Technical Report Nr. 87).

Anlage 1

DEFINITIONEN

AOP (Adverse Outcome Pathway): Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den auslösenden molekularen Vorgang bis in zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (2).

Auslösender molekularer Vorgang: Chemisch induzierte Störung eines biologischen Systems auf molekularer Ebene, die als Ausgangspunkt des Adverse Outcome Pathway identifiziert wird.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Eignung des Systems: Feststellung der Leistung (z. B. Empfindlichkeit) eines Instruments durch Analyse eines Referenzstandards vor dem Durchlauf der zu analysierenden Charge (22).

Einkomponentige Substanz: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

Empfindlichkeit: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Empfindlichkeit ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (21).

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Gemisch oder Lösung aus zwei oder mehr Stoffen, die nicht miteinander reagieren (1).

Genauigkeit: Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (21).

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer,

gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeitnehmer, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Gültige Prüfmethode: Eine Prüfmethode, die eine ausreichende Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck aufweist und auf wissenschaftlich fundierten Grundsätzen beruht. Eine Prüfmethode ist nie im absoluten Sinn, sondern nur in Bezug auf einen definierten Zweck (21) gültig.

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – Integrierter Test- und Bewertungsansatz): Strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbewertung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Chemikaliengruppe, bei dem alle maßgeblichen Daten strategisch integriert und gewichtet werden, um als Grundlage für fundierte regulatorische Entscheidungen über potenzielle Gefahren und/oder Risiken und/oder die Notwendigkeit weiterer gezielter und somit minimaler Testungen herangezogen zu werden.

Kalibrierungskurve: Beziehung zwischen dem im Versuch ermittelten Reaktionswert und der Analysekonzentration (auch als *Standardkurve* bezeichnet) eines bekannten Stoffs.

Mehrkomponentige Substanz: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden sind. Eine mehrkomponentige Substanz ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einer mehrkomponentigen Substanz besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Eine mehrkomponentige Substanz wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet das, was getestet wird.

Referenzkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Komponenten eines Testsystems enthält, einschließlich des Lösungsmittels oder Vehikels, und die mit den prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden, zu bestimmen. Bei der Testung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder

Vehikel mit dem Testsystem interagiert.

Relevanz: Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Sie berücksichtigt auch die Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (21).

Reproduzierbarkeit: Übereinstimmung der Ergebnisse von Tests, die an der gleichen Chemikalie bei einheitlichem Prüfprotokoll durchgeführt werden (siehe Zuverlässigkeit) (21).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (21).

Stoff: Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität notwendigen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können (1).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Variationskoeffizient: Kennwert der Varianz. Er wird für eine Gruppe von Replikatdaten mittels Division der Standardabweichung durch den Mittelwert berechnet. Multipliziert mit 100 ergibt sich ein Prozentwert.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Labors über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (21).

Anlage 2

LEISTUNGSSTOFFE

In-chemico-Hautsensibilisierung: Direkt-Peptidreaktivitätstest

Vor der routinemäßigen Anwendung dieser Prüfmethode sollten Labors ihre technische Kompetenz nachweisen, indem sie die erwartete DPRA-Vorhersage für die zehn in Tabelle 1 empfohlenen Leistungsstoffe richtig treffen und bei acht von zehn Leistungsstoffen für jedes Peptid Werte für die Cystein- und Lysin-Depletion erhalten, die im jeweiligen Referenzbereich liegen. Diese Leistungsstoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Reaktionen im Hinblick auf die Gefahr einer Hautsensibilisierung repräsentieren. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und das Vorhandensein hochwertiger In-vitro-Daten aus dem DPRA und dass diese in der vom EURL ECVAM koordinierten Validierungsstudie verwendet wurden, um die erfolgreiche Durchführung der Prüfmethode in den an der Studie beteiligten Labors nachzuweisen.

Tabelle 1: Empfohlene Leistungsstoffe für den Nachweis der technischen Kompetenz zur Durchführung des Direkt-Peptidreaktivitätstests

Leistungsstoffe	CAS-Nr.	Aggregatzustand	In-vivo-Vorhersage ¹	DPRA-Vorhersage ²	Bandbreite ³ der prozentualen Cysteinpeptid-Depletion	Bandbreite ³ der prozentualen Lysinpeptid-Depletion
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	Sensibilisator (extrem)	positiv	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	fest	Sensibilisator (extrem)	positiv	60-80	10-55
Formaldehyd	50-00-0	flüssig	Sensibilisator (stark)	positiv	30-60	0-24
Benzylidenaceton	122-57-6	fest	Sensibilisator (mäßig)	positiv	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	flüssig	Sensibilisator (schwach)	positiv	15-55	0-25
2,3-Butandion	431-03-8	flüssig	Sensibilisator (schwach)	positiv	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	flüssig	Nicht-sensibilisator	negativ	0-7	0-5,5
6-Methylcoumarin	92-48-8	fest	Nicht-sensibilisator	negativ	0-7	0-5,5
Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nicht-sensibilisator	negativ	0-7	0-5,5
4-Methoxyacetophenon	100-06-1	fest	Nicht-sensibilisator	negativ	0-7	0-5,5

¹ Die In-vivo-Gefahrenidentifizierung und (Potenz-)Vorhersagen basieren auf Daten des LLNA (19). Die In-vivo-Potenz wird anhand der vom ECETOC (23) vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet.

² Eine DPRA-Vorhersage ist im Rahmen eines IATA und gemäß den Bestimmungen unter den Nummern 9 und 11 zu betrachten.

³ Bestimmung der Bandbreiten auf der Grundlage von mindestens zehn Depletionswerten von sechs unabhängigen Labors.

Anlage 3

BEISPIELE FÜR DIE ANALYSESEQUENZ

Kalibrierungsstandards und Referenzkontrollen	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Verdünnungspuffer Referenzkontrolle A, Rep. 1 Referenzkontrolle A, Rep. 2 Referenzkontrolle A, Rep. 3
Koelutionskontrollen	Koelutionskontrolle 1 für Prüfchemikalie 1 Koelutionskontrolle 2 für Prüfchemikalie 2
Referenzkontrollen	Referenzkontrolle B, Rep. 1 Referenzkontrolle B, Rep. 2 Referenzkontrolle B, Rep. 3
Erster Replikatsatz	Referenzkontrolle C, Rep. 1 Zimtaldehyd, Rep. 1 Probe 1, Rep. 1 Probe 2, Rep. 1
Zweiter Replikatsatz	Referenzkontrolle C, Rep. 2 Zimtaldehyd, Rep. 2 Probe 1, Rep. 2 Probe 2, Rep. 2
Dritter Replikatsatz	Referenzkontrolle C, Rep. 3 Zimtaldehyd, Rep. 3 Probe 1, Rep. 3 Probe 2, Rep. 3
Referenzkontrollen	Referenzkontrolle B, Rep. 4

	Referenzkontrolle B, Rep. 5 Referenzkontrolle B, Rep. 6
--	--

Die Analysesequenz umfasst drei Sätze von Referenzkontrollen (d. h. Proben, die nur aus dem im geeigneten Lösungsmittel gelösten Peptid bestehen):

Referenzkontrolle A: Zur Verifizierung der Eignung des HPLC-Systems.

Referenzkontrolle B: Wird zu Beginn und am Ende der Analysesequenz aufgenommen, um die Stabilität der Referenzkontrollen im Zeitverlauf zu verifizieren.

Referenzkontrolle C: Wird in die Analysesequenz aufgenommen, um zu verifizieren, dass das zur Lösung der Prüfchemikalie verwendete Lösungsmittel keinen Einfluss auf die prozentuale Peptid-Depletion hat.

B.60 *In-vitro*-Hautsensibilisierung: ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 442D (2015). Ein Hautallergen ist gemäß Definition im Globalen Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN-GHS) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen¹ (CLP) ein Stoff, der bei Hautkontakt eine allergische Reaktion auslöst. Diese Prüfmethode ist ein *In-vitro*-Verfahren (ARE-Nrf2 Luciferase-Test) zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren gemäß UN-GHS (1) und CLP.
2. Es besteht allgemeines Einverständnis über die der Hautsensibilisierung zugrunde liegenden biologischen Schlüsselvorgänge. Das vorhandene Wissen über die chemischen und biologischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Hautsensibilisierung wurde in Form eines *Adverse Outcome Pathway* (AOP) (2) – vom molekularen auslösenden Vorgang über die dazwischen liegenden Vorgänge bis hin zur schädlichen Auswirkung auf die Gesundheit, z. B. allergische Kontaktdermatitis beim Menschen oder Kontakt-Überempfindlichkeit bei Nagetieren, – zusammengefasst (2) (3). Der molekulare auslösende Vorgang ist die kovalente Bindung von elektrophilen Stoffen an nukleophile Zentren in Hautproteinen. Der zweite Schlüsselvorgang in diesem AOP findet in den Keratinozyten statt und umfasst entzündliche Reaktionen sowie Genexpression in Verbindung mit spezifischen Zellsignalketten wie beispielsweise ARE (*Antioxidant/Electrophile Response Element*)-abhängigen Ketten. Der dritte Schlüsselvorgang ist die Aktivierung von dendritischen Zellen, die normalerweise durch Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern, Chemokinen und Cytokinen bewertet werden. Der vierte Schlüsselvorgang ist die T-Zellproliferation, die indirekt im Lokalen Lymphknotentest (LLNA) an der Maus (4) bewertet wird.
3. Die Bewertung der Hautsensibilisierung erfolgte normalerweise an Labortieren. Bei den klassischen Methoden an Meerschweinchen, dem Maximierungstest an Meerschweinchen

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

(GMPT) nach Magnusson/Kligman und dem Bühler-Test (TM B.6 (5)), werden die Induktions- und die Auslösephase der Hautsensibilisierung untersucht. Ein Test an der Maus, der Lokale Lymphknotentest (LLNA) (TM B.42 (4)) sowie die beiden nicht radioaktiven Abwandlungen dieses Tests, LLNA: DA (TM B.50 (6)) und LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), bei denen jeweils nur die Induktionsreaktion bewertet wird, haben ebenfalls an Akzeptanz gewonnen, da sie sowohl in Bezug auf den Tierschutz als auch in Bezug auf die objektive Messung der Induktionsphase der Hautsensibilisierung Vorteile gegenüber Tests am Meerschweinchen bieten.

4. Vor Kurzem wurden mechanistisch basierte In-chemico- und In-vitro-Prüfmethoden für die Bewertung der Gefahr einer Hautsensibilisierung durch Chemikalien als wissenschaftlich fundiert befunden. Allerdings sind Methodenkombinationen ohne Tierversuche (in silico, in chemico, in vitro) im Rahmen von Integrierten Test- und Bewertungsansätzen (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA) erforderlich, um die gegenwärtig verwendeten Tierversuche angesichts der eingeschränkten mechanistischen AOP-Abdeckung der gegenwärtig verfügbaren Prüfmethoden ohne Tierversuche vollständig zu ersetzen (2) (3).
5. Diese Prüfmethode (ARE-Nrf2 Luciferase-Test) wird für den unter Nummer 2 erläuterten zweiten Schlüsselvorgang vorgeschlagen. Es wurde berichtet, dass Hautallergene Gene induzieren können, die durch das *Antioxidant Response Element* (ARE) reguliert werden (8) (9). Kleinmolekulare elektrophile Stoffe wie beispielsweise Hautallergene können auf das Sensorprotein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) einwirken, beispielsweise durch kovalente Modifizierung seines Cysteinrests, was zu einer Dissoziation vom Transkriptionsfaktor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) führt. Das dissoziierte Nrf2 kann dann ARE-abhängige Gene wie beispielsweise jene, die Phase-II-Entgiftungsenzyme codieren, aktivieren (8) (10) (11).
6. Gegenwärtig ist der einzige In-vitro-ARE-Nrf2-Luciferase-Test, der durch diese Prüfmethode abgedeckt wird, der KeratinoSensTM-Test, für den Validierungsstudien abgeschlossen wurden (9) (12) (13), denen ein unabhängiger Peer-Review des Europäischen Referenzlabors für Alternativen zu Tierversuchen (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*, EURL ECVAM) folgte (14). Der KeratinoSensTM-Test wurde als aus wissenschaftlicher Sicht für die Anwendung als Teil eines IATA zulässig befunden, um die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren im Hinblick auf die Gefahreinstufung und -kennzeichnung zu unterstützen (14). Labors, die die Prüfmethode durchführen möchten, können die im KeratinoSensTM-Test verwendete rekombinante Zelllinie durch Abschluss einer Lizenzvereinbarung mit dem Entwickler der Prüfmethode erhalten (15).
7. Definitionen sind Anlage 1 zu entnehmen.

VORBEMERKUNGEN, ANWENDBARKEIT UND EINSATZGRENZEN

8. Da sich die Aktivierung der Keap1-Nrf2-ARE-Kette nur auf den zweiten Schlüsselvorgang des Hautsensibilisierungs-AOP bezieht, reichen Informationen aus Prüfmethode auf der Grundlage der Aktivierung dieser Kette wahrscheinlich alleine nicht aus, um Schlussfolgerungen über das Hautsensibilisierungspotenzial von Chemikalien zu ziehen. Daher sollten die mit der gegenwärtigen Prüfmethode ermittelten Daten im Rahmen integrierter Ansätze, wie z. B. IATA, betrachtet und mit anderen ergänzenden Informationen, die beispielsweise aus In-vitro-Tests in Bezug auf andere Schlüsselvorgänge des Hautsensibilisierungs-AOP abgeleitet werden, sowie anderen Nicht-Prüfmethode, einschließlich chemischer Analogien, kombiniert werden. Beispiele für die Verwendung der ARE-Nrf2-Luciferase-Prüfmethode in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (13) (16) (17) (18) (19).
9. Diese Prüfmethode kann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP-Kategorie 1) und Nichtsensibilisatoren im Rahmen eines IATA eingesetzt werden. Diese Prüfmethode kann alleine weder zur Einstufung von Hautallergenen in die Unterkategorien 1A und 1B gemäß Definition in UN-GHS/CLP noch zur Vorhersage der Potenz im Rahmen von Sicherheitsbewertungsentscheidungen verwendet werden. Jedoch kann ein positives Ergebnis je nach Rechtsrahmen alleine zur Einstufung einer Chemikalie in die UN-GHS/CLP-Kategorie 1 herangezogen werden.
10. Die Daten aus der Validierungsstudie und den internen Prüfungen im Rahmen des unabhängigen Peer-Review der Prüfmethode haben ergeben, dass der KeratinoSensTM-Test an Labors mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkultur übertragen werden kann. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei der Prüfmethode erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 85 % innerhalb und zwischen Labors (14). Die Genauigkeit (77 % – 155/201), Empfindlichkeit (78 % – 71/91) und Spezifität (76 % – 84/110) des KeratinoSensTM-Tests für die Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP-Kat. 1) und Nichtsensibilisatoren wurden unter Berücksichtigung aller Daten, die vom EURL ECVAM für die Bewertung und das Peer-Review der Prüfmethode vorgelegt wurden, im Vergleich zu den LLNA-Ergebnissen ermittelt (14). Diese Zahlen sind vergleichbar mit den Zahlen, die kürzlich basierend auf internen Prüfungen von ungefähr 145 Stoffen veröffentlicht wurden (Genauigkeit 77 %, Empfindlichkeit 79 %, Spezifität 72 %) (13). Beim KeratinoSensTM-Test ist die Wahrscheinlichkeit einer Unterschätzung bei Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B) größer als bei Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (13) (14). Insgesamt deuten diese Informationen auf die Zweckmäßigkeit des KeratinoSensTM-Tests für die Erkennung der Gefahr einer Hautsensibilisierung hin. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für den KeratinoSensTM-Test als eigenständiger Test angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da die Prüfmethode in Kombination mit anderen

Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 9 oben betrachtet werden sollte. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Prüfmethode zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA sowie andere Tierversuche die Situation bei der untersuchten Spezies, d. h. Menschen, nicht vollständig widerspiegeln.

11. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was getestet wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der ARE-Nrf2-Luciferase-Prüfmethode hinsichtlich der Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über den KeratinoSensTM-Test wurde nachgewiesen, dass der Test bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzen (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (9) (12) (13) (14). Es wurden zwar hauptsächlich einkomponentige Stoffe getestet, jedoch liegen auch begrenzte Daten über die Prüfung von Gemischen vor (20). Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regelungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum. Diese Überlegungen erübrigen sich, sofern die Durchführung von Tests für das Gemisch gesetzlich vorgeschrieben ist. Zudem sollte bei mehrkomponentigen Stoffen oder Gemischen die mögliche Interferenz der zytotoxischen Komponenten mit den beobachteten Reaktionen beachtet werden. Die Prüfmethode ist bei löslichen Prüfchemikalien oder solchen Prüfchemikalien anwendbar, die eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, worin sich die Prüfchemikalie nicht absetzen oder in anderen Phasen vom Lösungsmittel trennen kann) in Wasser oder DMSO (einschließlich aller technischen Komponenten im Falle der Prüfung eines mehrkomponentigen Stoffes oder Gemischs) bilden. Prüfchemikalien, die diese Bedingungen bei der höchsten erforderlichen Konzentration von 2000 µM (siehe Nummer 22) nicht erfüllen, können trotzdem bei niedrigeren Konzentrationen geprüft werden. In einem solchen Fall könnten Ergebnisse, die die unter Nummer 39 beschriebenen Bedingungen für die Positivität erfüllen, dennoch unterstützend zur Identifizierung der Prüfchemikalie als Hautallergen herangezogen werden, während ein negatives Ergebnis, das bei Konzentrationen < 1000 µM erzielt wird, als nicht aussagekräftig zu betrachten ist (siehe Vorhersagemodell unter Nummer 39). Im Allgemeinen wurden Stoffe mit einem LogP-Wert bis 5 erfolgreich geprüft, während extrem hydrophobe Stoffe mit LogP > 7 außerhalb der bekannten Anwendbarkeit der Prüfmethode liegen (14). Für Stoffe mit einem LogP-Wert zwischen 5 und 7 liegen nur beschränkte Informationen vor.
12. Negative Ergebnisse sind mit Vorsicht auszulegen, da Stoffe mit ausschließlicher Reaktivität gegenüber Lysinresten durch die Prüfmethode als negativ erkannt werden

können. Außerdem können Prohaptene (d. h. Chemikalien, die beispielsweise über P450-Enzyme aktiviert werden müssen) und Prähaptene (d. h. Chemikalien, die durch Selbstoxidation aktiviert werden) aufgrund der begrenzten Stoffwechselfähigkeit der verwendeten Zelllinie (21) sowie der Versuchsbedingungen, insbesondere bei geringer Oxidationsgeschwindigkeit, zu negativen Ergebnissen führen. Andererseits können Prüfchemikalien, die zwar nicht als Allergene, aber dennoch als chemische Stressoren wirken, zu falschen positiven Ergebnissen führen (14). Zudem lassen sich hochgradig zytotoxische Prüfchemikalien nicht immer zuverlässig bewerten. Schließlich können Prüfchemikalien, die mit dem Luciferase-Enzym interferieren, die Aktivität der Luciferase in zellbasierten Tests stören, was entweder zu scheinbarer Hemmung oder verstärkter Lumineszenz führt (22). Beispielsweise wurde berichtet, dass Phytoöstrogenkonzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ die Lumineszenzsignale in anderen auf Luciferase basierenden Reporter-Gen-Tests aufgrund der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens stören (23). Infolgedessen muss die Luciferase-Expression, die bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Chemikalien, die vermutlich eine mit Phytoöstrogen vergleichbare Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens bewirken, sorgfältig untersucht werden (23). In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit der Prüfmethode bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen werden kann, sollte die Prüfmethode bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

13. Abgesehen von der Unterstützung bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren liefert der KeratinoSensTM-Test auch Konzentrations-/Wirkungs-Informationen, die potenziell zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz bei Verwendung in integrierten Ansätzen wie beispielsweise IATA beitragen können (19). Darüber hinaus sind weitere Untersuchungen, vorzugsweise auf der Grundlage verlässlicher Humandaten, notwendig, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse des KeratinoSensTM-Tests zur Potenzbewertung (24) und Einstufung von Allergenen in Unterkategorien gemäß UN-GHS/CLP beitragen können.

TESTPRINZIP

14. Die ARE-Nrf2-Luciferase-Prüfmethode basiert auf einer immortalisierten, adhären Zelle, die aus humanen und mit einem wählbaren Plasmid stabil transfizierten HaCaT-Keratinozyten abgeleitet wurde. Die Zelllinie enthält das Luciferase-Gen unter der transkriptionalen Kontrolle eines konstitutiven Promotors, verschmolzen mit einem ARE-Element aus einem Gen, das bekanntermaßen durch Kontaktsensibilisatoren hochreguliert wird (25) (26). Das Luciferase-Signal spiegelt die Aktivierung durch Sensibilisatoren der endogenen Nrf2-abhängigen Gene wider, wobei die Abhängigkeit des Luciferase-Signals in der rekombinanten Zelllinie von Nrf2 nachgewiesen wurde (27). Dies ermöglicht die quantitative Messung (durch Lumineszenzerkennung) der Luciferase-Geninduktion unter

Verwendung von bekannten lichterzeugenden Luciferase-Substraten als Indikator für die Aktivität des Nrf2-Transkriptionsfaktors in Zellen nach Exposition gegenüber elektrophilen Stoffen.

15. Prüfchemikalien werden im KeratinoSensTM-Test als positiv angesehen, wenn sie eine statistisch signifikante Induktion der Luciferase-Aktivität oberhalb einer gegebenen Schwelle (d. h. > 1,5-facher Wert oder Anstieg um 50 %) bewirken, und zwar unterhalb einer festgelegten Konzentration, die sich nicht signifikant auf die Zellviabilität auswirkt (d. h. unter 1000 µM und bei einer Konzentration, bei der die Zellviabilität mehr als 70 % beträgt (9) (12)). Zu diesem Zweck wird die maximal-fache Induktion der Luciferase-Aktivität über eine (Negativ-)Lösungsmittel-Kontrolle (I_{max}) bestimmt. Da die Zellen ferner verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalien ausgesetzt werden, sollte die erforderliche Konzentration für eine statistisch signifikante Induktion der Luciferase-Aktivität oberhalb der Schwelle (d. h. $EC_{1.5}$ -Wert) aus der Dosis-Wirkungs-Kurve interpoliert werden (für Berechnungen siehe Nummer 32). Schließlich sollten parallele zytotoxische Messungen durchgeführt werden, um zu bewerten, ob die Induktionswerte der Luciferase-Aktivität bei subzytotoxischen Konzentrationen auftreten.
16. Vor der routinemäßigen Anwendung des ARE-Nrf2-Luciferase-Tests, der den Anforderungen der vorliegenden Prüfmethode genügt, sollte die technische Leistungsfähigkeit der Labors anhand der in Anlage 2 aufgeführten zehn Leistungsstoffe nachgewiesen werden.
17. Es stehen Leistungsnormen (28) zur Verfügung, die die Validierung neuer oder geänderter In-vitro-ARE-Nrf2-Luciferase-Prüfmethoden ähnlich dem KeratinoSensTM-Test sowie die rechtzeitige Anpassung dieser Prüfmethode für deren Einbeziehung ermöglichen. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen wird nur für Prüfmethode garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Prüfmethode von der OECD überprüft und in die entsprechende Prüfrichtlinie aufgenommen wurden.

VERFAHREN

18. Gegenwärtig ist die einzige unter diese Prüfmethode fallende Methode der wissenschaftlich validierte KeratinoSensTM-Test (9) (12) (13) (14). Es liegen Standardarbeitsanweisungen für den KeratinoSensTM-Test vor, die bei der Umsetzung und Verwendung dieser Prüfmethode im Labor angewendet werden sollten (15). Labors, die die Prüfmethode durchführen möchten, können die im KeratinoSensTM-Test verwendete rekombinante Zelllinie durch Abschluss einer Lizenzvereinbarung mit dem Entwickler der Prüfmethode erhalten. Nachfolgend werden die Hauptkomponenten und Verfahren der ARE-Nrf2-Luciferase-Prüfmethode beschrieben.

Vorbereitung der Keratinozytenkulturen

19. Es sollte eine transgene Zelllinie mit einer stabilen Insertion des Luciferase-Reporter-Gens unter der Kontrolle des ARE-Elements verwendet werden (z. B. KeratinoSensTM-Zelllinie). Bei Erhalt werden die Zellen propagiert (z. B. 2 bis 4 Passagen) und als homogener Stamm eingefroren aufbewahrt. Zellen aus diesem ursprünglichen Stamm können bis zu einer Höchstzahl von Passagen (z. B. 25 im Fall von KeratinoSensTM) propagiert und für routinemäßige Tests unter Verwendung des geeigneten Trägermediums eingesetzt werden (im Fall von KeratinoSensTM ist dies serum- und Geneticin-haltiges DMEM).
20. Für die Prüfung sollten die Zellen zu 80 bis 90 % konfluent sein, und es sollte darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht zu vollständiger Konfluenz zusammengewachsen sind. Einen Tag vor der Prüfung werden die Zellen gewonnen und in 96-Mulden-Platten (10 000 Zellen/Mulde im Fall von KeratinoSensTM) verteilt. Eine Sedimentation der Zellen bei der Beimpfung ist zu vermeiden, um eine homogene quantitative Verteilung der Zellen in den Mulden zu gewährleisten. Ist dies nicht der Fall, kann dieser Schritt zu einer hohen Variabilität zwischen den Mulden führen. Bei jeder Wiederholung werden drei Replikate für die Messungen der Luciferase-Aktivität und ein paralleles Replikat für den Zellviabilitätstest verwendet.

Vorbereitung der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

21. Die Prüfchemikalie sowie die Kontrollstoffe werden am Tag der Prüfung vorbereitet. Für den KeratinoSensTM-Test werden die Prüfchemikalien in Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zur gewünschten Endkonzentration gelöst (z. B. 200 mM). Die DMSO-Lösungen können als selbststerilisierend angesehen werden, sodass keine sterile Filtration erforderlich ist. Prüfchemikalien, die nicht in DMSO löslich sind, werden in sterilem Wasser oder Kulturmedium gelöst und die Lösungen beispielsweise durch Filtration sterilisiert. Bei einer Prüfchemikalie ohne festgelegtes Molekulargewicht wird im KeratinoSensTM-Test eine Stammlösung mit einer Standardkonzentration hergestellt (40 mg/ml oder 4 % (w/v)). Falls andere Lösungsmittel als DMSO, Wasser oder Kulturmedium zum Einsatz kommen, sollten ausreichende wissenschaftliche Gründe vorgelegt werden.
22. Basierend auf den DMSO-Stammlösungen der Prüfchemikalie werden Verdünnungsreihen unter Verwendung von DMSO hergestellt, um 12 Hauptkonzentrationen der zu prüfenden Chemikalie zu erhalten (von 0,098 bis 200 mM im KeratinoSensTM-Test). Bei einer nicht in DMSO löslichen Prüfchemikalie werden die Verdünnungen zum Erhalt der Hauptkonzentrationen unter Verwendung von sterilem Wasser oder Kulturmedium hergestellt. Unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel werden die Hauptkonzentrationen dann weiter 25-fach im serumhaltigen Kulturmedium verdünnt und schließlich für die Behandlung mit einem weiteren 4-fachen Verdünnungsfaktor verwendet, sodass die Endkonzentrationen der geprüften Chemikalie im KeratinoSensTM-

Test zwischen 0,98 und 2000 μM liegen. Andere Konzentrationen können verwendet werden, sofern dies gerechtfertigt ist (z. B. bei Zytotoxizität oder schlechter Löslichkeit).

23. Die Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrolle, die im KeratinoSensTM-Test verwendet wird, ist DMSO (CAS Nr. 67-68-5, $\geq 99\%$ Reinheit), wobei sechs Mulden pro Platte vorbereitet werden. Dabei werden die gleichen Verdünnungen wie für die Hauptkonzentrationen unter Nummer 22 hergestellt, sodass die Endkonzentration der Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrolle 1 % beträgt. Diese Konzentration wirkt sich bekanntermaßen nicht auf die Zellviabilität aus und entspricht der DMSO-Konzentration in der geprüften Chemikalie und der Positivkontrolle. Bei einer nicht in DMSO löslichen Chemikalie, bei der Verdünnungen in Wasser hergestellt wurden, muss der DMSO-Wert in allen Mulden der endgültigen Prüflösung wie bei den anderen Prüfchemikalien und Kontrollstoffen an 1 % angepasst werden.
24. Die Positivkontrolle, die im Fall des KeratinoSensTM-Tests verwendet ist, ist Zimtaldehyd (CAS Nr. 14371-10-9, $\geq 98\%$ Reinheit), wobei eine Reihe von 5 Hauptkonzentrationen zwischen 0,4 und 6,4 mM in DMSO (ausgehend von einer Stammlösung mit 6,4 mM) hergestellt und wie für die Hauptkonzentrationen unter Nummer 22 beschrieben verdünnt wird, sodass die Endkonzentrationen der Positivkontrolle zwischen 4 und 64 μM liegen. Andere geeignete Positivkontrollen, vorzugsweise mit $\text{EC}_{1,5}$ -Werten im mittleren Bereich, können verwendet werden, sofern historische Daten vorliegen, aus denen vergleichbare Versuchsakzeptanzkriterien abgeleitet werden können.

Applikation der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

25. Für jede Prüfchemikalie und jeden Positivkontrollstoff ist ein Versuch erforderlich, um eine Vorhersage (positiv oder negativ), bestehend aus mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen mit je drei Replikaten (d. h. $n = 6$), abzuleiten. Weichen die Ergebnisse zwischen den beiden unabhängigen Wiederholungen ab, sollte eine dritte Wiederholung mit drei Replikaten (d. h. $n = 9$) durchgeführt werden. Jede unabhängige Wiederholung wird an einem anderen Tag mit einer frischen Stammlösung der Prüfchemikalie und unabhängig voneinander gewonnenen Zellen vorgenommen. Die Zellen können jedoch aus derselben Passage stammen.
26. Nach der Beimpfung wie unter Nummer 20 beschrieben lässt man die Zellen 24 Stunden in den 96-Mulden-Mikrotiterplatten wachsen. Das Medium wird dann entfernt und durch frisches Kulturmedium (150 μl serumhaltiges Kulturmedium, jedoch ohne Geneticin im Fall von KeratinoSensTM) ersetzt, dem 50 μl der 25-fach verdünnten Prüfchemikalie und Kontrollstoffe zugegeben werden. Mindestens eine Mulde pro Platte sollte zur Bewertung der Background-Werte leer gelassen werden (ohne Zellen und Behandlung).
27. Die behandelten Platten werden im KeratinoSensTM-Test ungefähr 48 Stunden bei $37 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ in der Gegenwart von 5 % CO_2 inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung

der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden wird, indem die Platten beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien mit einer Folie abgedeckt werden.

Messungen der Luciferase-Aktivität

28. Zur Gewährleistung angemessener Lumineszenz-Messwerte sind drei Faktoren entscheidend:

- Wahl eines empfindlichen Luminometers
- Verwendung eines Plattenformats mit ausreichender Höhe zur Vermeidung einer Kreuzkontamination
- Verwendung eines Luciferase-Substrats mit ausreichender Lichtausbeute zur Gewährleistung einer hinreichenden Empfindlichkeit und geringen Variabilität.

Vor der Prüfung sollte ein Kontrollversuch wie in Anlage 3 beschrieben durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass die drei genannten Bedingungen erfüllt sind.

29. Nach einer Expositionsdauer von 48 Stunden mit der Prüfchemikalie und den Kontrollstoffen im KeratinoSensTM-Test werden die Zellen mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung gewaschen. Ferner wird jeder Mulde der relevante Lysepuffer für Lumineszenzmessungen 20 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt.

30. Die Platten mit dem Zelllysate werden dann zur Messung in das Luminometer gestellt, das im KeratinoSensTM-Test wie folgt programmiert wird: i) Hinzufügen des Luciferase-Substrats zu jeder Mulde (d. h. 50 µl), ii) Abwarten von 1 Sekunde und iii) Integration der Luciferase-Aktivität für 2 Sekunden. Bei Verwendung anderer Einstellungen, z. B. je nach verwendetem Luminometermodell, sollten diese begründet werden. Darüber hinaus kann auch ein Glimmsubstrat verwendet werden, sofern der in Anlage 3 beschriebene Qualitätssicherungsversuch erfolgreich durchgeführt wird.

Bewertung der Zytotoxizität

31. Für den KeratinoSensTM-Zellviabilitätstest wird das Medium nach der Expositionsdauer von 48 Stunden durch frisches Medium ersetzt. Dieses Medium enthält MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolylblau Tetrazoliumbromid; CAS Nr. 298-93-1) und Zellen, die 4 Stunden bei 37 °C in der Gegenwart von 5 % CO₂ inkubiert wurden. Das MTT-Medium wird dann entfernt und die Zellen werden über Nacht lysiert (z. B. durch Hinzufügen von 10 %iger SDS-Lösung zu jeder Mulde). Nach dem Schütteln wird die Absorption bei 600 nm mit einem Photometer gemessen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

32. Die folgenden Parameter werden im KeratinoSensTM-Test berechnet:

- durchschnittliche maximal-fache Induktion der Luciferase-Aktivität (I_{\max}), die bei jeder Konzentration der geprüften Chemikalie und Positivkontrolle beobachtet wurde;
- $EC_{1,5}$ -Wert entsprechend der Konzentration, bei der die Induktion der Luciferase-Aktivität über der 1,5-fachen Schwelle liegt (d. h. um 50 % verstärkte Luciferase-Aktivität wurde erzielt); und
- IC_{50} - und IC_{30} -Konzentrationswerte für eine Verringerung der Zellviabilität um 50 % und 30 %.
- Die n-fache Induktion der Luciferase-Aktivität wird durch Gleichung 1 und die allgemeine maximal-fache Induktion (I_{\max}) als Durchschnitt der einzelnen Wiederholungen berechnet.

$$\text{Gleichung 1: } n - \text{fache Induktion} = \frac{(L_{\text{Probe}} - L_{\text{Blindversuch}})}{(L_{\text{Lösungsmittel}} - L_{\text{Blindversuch}})}$$

Dabei sind:

L_{Probe} : Lumineszenz-Messwert in der Prüfchemikalien-Mulde

L_{Leer} : Lumineszenz-Messwert in der leeren Mulde (ohne Zellen und Behandlung)

$L_{\text{Lösungsmittel}}$: durchschnittlicher Lumineszenz-Messwert in den Mulden, die Zellen und (Negativ-)Lösungsmittel-Kontrolle enthalten

$EC_{1,5}$ wird durch lineare Interpolation anhand von Gleichung 2 und der $EC_{1,5}$ -Gesamtwert als geometrisches Mittel der einzelnen Wiederholungen berechnet.

$$\text{Gleichung 2: } EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

Dabei sind:

C_a : niedrigste Konzentration in μM bei $> 1,5$ -facher Induktion

C_b : höchste Konzentration in μM bei $< 1,5$ -facher Induktion

- I_a: n-fache Induktion, gemessen bei der niedrigsten Konzentration bei > 1,5-facher Induktion (Mittel von drei Replikat-Mulden)
- I_b: n-fache Induktion, gemessen bei der höchsten Konzentration bei < 1,5-facher Induktion (Mittel von drei Replikat-Mulden)

Die Viabilität wird durch Gleichung 3 berechnet:

$$\text{Gleichung 3: Viabilität} = \frac{(V_{\text{Probe}} - V_{\text{Blindversuch}})}{(V_{\text{Lösungsmittel}} - V_{\text{Blindversuch}})} \times 100$$

Dabei sind:

V_{Probe}: MTT-Absorptions-Messwert in der Prüfchemikalien-Mulde

V_{leer}: MTT-Absorptions-Messwert in der leeren Mulde (ohne Zellen und Behandlung)

V_{Lösungsmittel}: durchschnittlicher MTT-Absorptions-Messwert in den Mulden, die Zellen und (Negativ-)Lösungsmittel-Kontrolle enthalten

IC₅₀ und IC₃₀ werden durch lineare Interpolation anhand von Gleichung 4 und die IC₅₀- und IC₃₀-Gesamtwerte als geometrisches Mittel der einzelnen Wiederholungen berechnet.

$$\text{Gleichung 4: } IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100-x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

Dabei sind:

X: prozentuale Verringerung bei der zu berechnenden Konzentration (50 und 30 bei IC₅₀ und IC₃₀)

C_a: niedrigste Konzentration in µM bei > x % Verringerung der Viabilität

C_b: höchste Konzentration in µM bei < x % Verringerung der Viabilität

V_a: prozentuale Viabilität bei der niedrigsten Konzentration bei > x % Verringerung der Viabilität

V_b: prozentuale Viabilität bei der höchsten Konzentration bei < x % Verringerung der Viabilität

Für jede Konzentration, bei der die Induktion der Luciferase-Aktivität mehr als das 1,5-fache beträgt, wird die statistische Signifikanz berechnet (z. B. durch einen zweiseitigen Student-t-Test), wobei die Lumineszenzwerte für die drei Replikate mit den Lumineszenzwerten in den Mulden der (Negativ-)Lösungsmittel-Kontrolle verglichen werden, um zu ermitteln, ob die Induktion der Luciferase-Aktivität statistisch signifikant ist ($p < 0,05$). Die niedrigste Konzentration, bei der die Induktion der Luciferase-Aktivität mehr als das 1,5-fache beträgt, ist der Wert zur Bestimmung des $EC_{1,5}$ -Werts. Es wird in jedem Fall geprüft, ob dieser Wert unter dem IC_{30} -Wert liegt, was darauf hindeutet, dass die Verringerung der Zellviabilität bei der bestimmenden Konzentration für den $EC_{1,5}$ -Wert weniger als 30 % beträgt.

33. Es wird empfohlen, die Daten anhand von Diagrammen visuell zu überprüfen. Wenn keine eindeutige Dosis-Wirkungs-Kurve beobachtet wird oder wenn die ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve pfadspezifisch ist (d. h. die Schwelle von 1,5 zweimal überschritten wird), sollte der Versuch wiederholt werden, um zu prüfen, ob dies für die Prüfchemikalie spezifisch oder auf einen Versuchsartefakt zurückzuführen ist. Falls die biphasige Wirkung in einem unabhängigen Versuch reproduziert werden kann, ist der niedrigere $EC_{1,5}$ -Wert (Konzentration, bei der die Schwelle von 1,5 erstmalig überschritten wird) anzugeben.
34. In den seltenen Fällen, in denen eine statistisch nicht signifikante Induktion über dem 1,5-fachen gefolgt von einer höheren Konzentration mit einer statistisch signifikanten Induktion beobachtet wird, werden die Ergebnisse aus dieser Wiederholung nur dann als gültig und positiv angesehen, wenn die statistisch signifikante Induktion über der Schwelle von 1,5 bei einer nicht zytotoxischen Konzentration ermittelt wurde.
35. Bei Prüfchemikalien, die bereits bei der niedrigsten Testkonzentration von $0,98 \mu\text{M}$ eine 1,5-fache oder höhere Induktion erzeugen, wird der $EC_{1,5}$ -Wert $< 0,98$ basierend auf der visuellen Überprüfung der Dosis-Wirkungs-Kurve festgelegt.

Akzeptanzkriterien

36. Bei der Verwendung des KeratinoSensTM-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden. Erstens sollte die Induktion der Luciferase-Aktivität, die bei der Positivkontrolle (Zimtaldehyd) erzeugt wird, bei mindestens einer der geprüften Konzentrationen (4 bis $64 \mu\text{M}$) statistisch signifikant über der Schwelle von 1,5 (z. B. bei Verwendung eines T-Tests) liegen.
37. Zweitens sollte der $EC_{1,5}$ -Wert innerhalb von zwei Standardabweichungen vom historischen Mittelwert der Prüfanstalt liegen (z. B. zwischen $7 \mu\text{M}$ und $30 \mu\text{M}$ basierend auf dem Validierungsdatensatz), der regelmäßig aktualisiert werden sollte. Darüber hinaus sollte die durchschnittliche Induktion in den drei Replikaten für Zimtaldehyd bei $64 \mu\text{M}$ zwischen 2 und 8 liegen. Ist letzteres Kriterium nicht erfüllt, sollte die Dosis-Wirkung von

Zimtaldehyd sorgfältig überprüft werden. Tests sind nur dann akzeptabel, wenn die Dosis-Wirkungs-Beziehung eindeutig ist, wobei die Induktion der Luciferase-Aktivität bei zunehmenden Konzentrationen in der Positivkontrolle ansteigt.

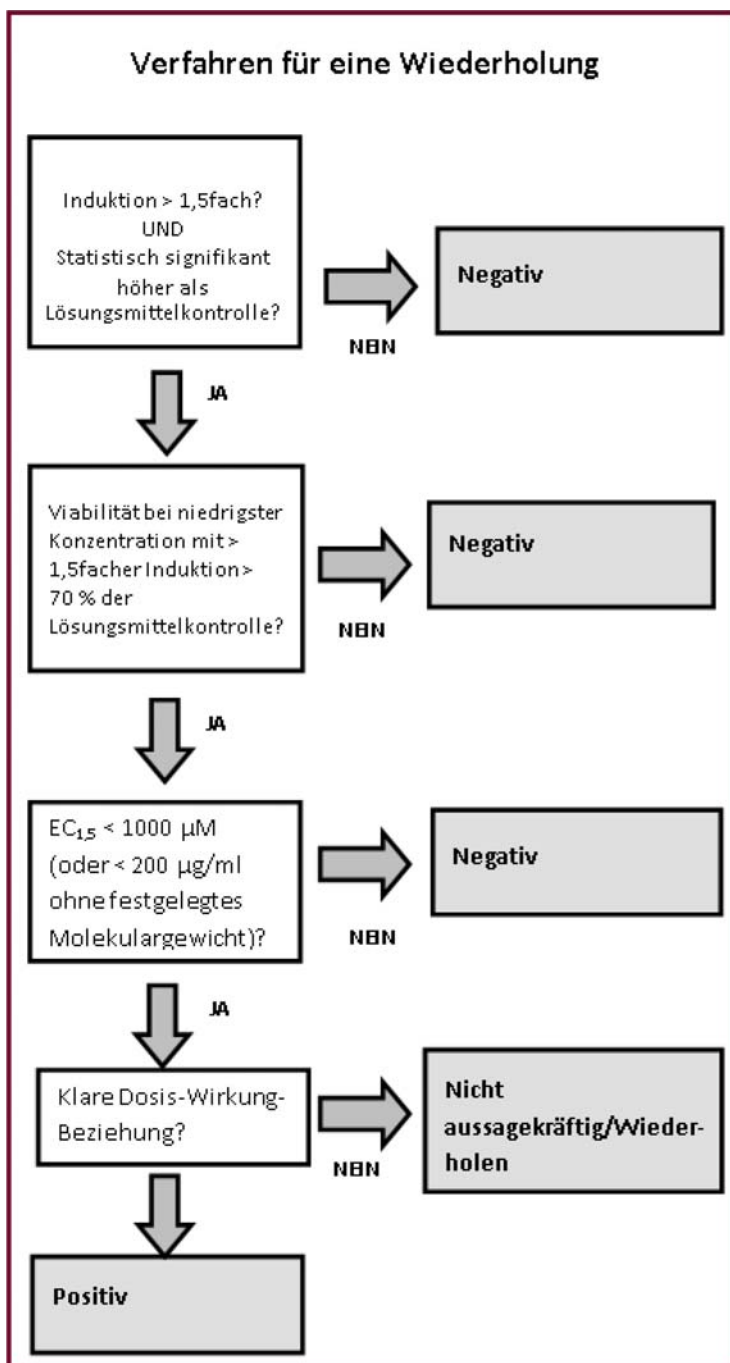
38. Schließlich sollte der durchschnittliche Variationskoeffizient des Lumineszenz-Messwerts für die Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrolle (DMSO) bei jeder Wiederholung, bestehend aus 6 dreifach geprüften Mulden, unter 20 % liegen. Liegt die Variabilität über diesem Wert, sollten die Ergebnisse ignoriert werden.

Interpretation der Ergebnisse und Vorhersagemodell

39. Eine KeratinoSensTM-Vorhersage wird als positiv betrachtet, wenn die folgenden vier Bedingungen alle bei 2 von 2 oder bei denselben 2 von 3 Wiederholungen erfüllt sind. Andernfalls wird die KeratinoSensTM-Vorhersage als negativ erachtet (Abbildung 1):

1. I_{\max} ist größer als ($>$) der 1,5-fache Wert und statistisch signifikant abweichend im Vergleich zur (Negativ-)Lösungsmittel-Kontrolle (wie durch einen zweiseitigen, unpaarigen Student-T-Test bestimmt);
2. die Zellviabilität ist größer als ($>$) 70 % der niedrigsten Konzentration mit Induktion von Luciferase-Aktivität über dem 1,5-fachen Wert (d. h. bei bestimmender Konzentration für den $EC_{1,5}$ -Wert);
3. der $EC_{1,5}$ -Wert ist kleiner als ($<$) 1000 μM (oder $<$ 200 $\mu\text{g/ml}$ bei Prüfchemikalien ohne festgelegtes Molekulargewicht);
4. es besteht eine augenscheinliche allgemeine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Induktion der Luciferase-Aktivität (oder eine biphasige Wirkung wie unter Nummer 33 erwähnt).

Wenn bei einer gegebenen Wiederholung die ersten drei Bedingungen erfüllt sind, jedoch keine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Induktion der Luciferase-Aktivität beobachtet werden kann, ist das Ergebnis dieser Wiederholung als nicht aussagekräftig anzusehen, sodass eventuell weitere Prüfungen erforderlich sind (Abbildung 1). Zudem ist ein negatives Ergebnis bei Konzentrationen $<$ 1000 μM (oder $<$ 200 $\mu\text{g/ml}$ bei Prüfchemikalien ohne festgelegtes Molekulargewicht) ebenfalls als nicht aussagekräftig zu betrachten (siehe Nummer 11).



Es sind mindestens zwei unabhängige Wiederholungen durchzuführen

- Sind beide Wiederholungen positiv, ist das Endergebnis: POSITIV
- Sind beide Wiederholungen negativ, ist das Endergebnis: NEGATIV

Sind die ersten beiden Wiederholungen nicht übereinstimmend, ist eine dritte Wiederholung durchzuführen und das Ergebnis entsprechend zu bestimmen (d. h. 2 von 3).

Abbildung 1: Vorhersagemodell des KeratinoSens™-Tests. Eine KeratinoSens™-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Nummern 9 und 11 in Betracht gezogen werden.

40. In seltenen Fällen können Prüfchemikalien, bei denen die Induktion der Luciferase-Aktivität sehr nahe bei zytotoxischen Werten erfolgt, in einigen Wiederholungen bei nicht zytotoxischen Werten (d. h. bestimmende Konzentration für den $EC_{1,5}$ -Wert unter (\leq) IC_{30}) und in anderen Wiederholungen nur bei zytotoxischen Werten (d. h. bestimmende

Konzentration für den EC_{1,5}-Wert größer als (>) IC₃₀) positiv sein. Solche Prüfchemikalien sind erneut im Rahmen einer sehr genauen Dosis-Wirkungs-Analyse unter Verwendung eines geringeren Verdünnungsfaktors (z. B. 1,33 oder $\sqrt{2}$ (= 1,41)-fache Verdünnung zwischen Mulden) zu prüfen, um festzustellen, ob die Induktion bei zytotoxischen Werten aufgetreten ist oder nicht (9).

Prüfbericht

41. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie

- Einkomponentiger Stoff:
 - chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
 - physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar;
 - Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
 - Behandlung vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
 - geprüfte Konzentration(en);
 - Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.
- Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoff und Gemisch:
 - Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Komponenten, soweit verfügbar;
 - physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar;
 - Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/ Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;

- Behandlung vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Kontrollen

- Positivkontrolle:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- physikalisches Erscheinungsbild, Löslichkeit in Wasser, Löslichkeit in DMSO, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, sofern verfügbar und falls zutreffend;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf dokumentieren.

- Negativ-(Vehikel-)Kontrolle:

- Chemische Kennung, wie beispielsweise IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n) und/oder sonstige Kennungen;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- physikalisches Erscheinungsbild, Molekulargewicht und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften, falls andere als die in dieser Prüfmethode genannten Negativkontrollen/Vehikel verwendet werden, und sofern verfügbar;

- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Beschreibung der angewandten Prüfmethode;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);
- Passagenzahl und Konfluenzwert der geprüften Zellen;
- angewandte Zellzählungsmethode bei der Beimpfung vor der Prüfung und ergriffene Maßnahmen zur Gewährleistung einer homogenen quantitativen Verteilung der Zellen (siehe Nummer 20);
- verwendetes Luminometer (z. B. Modell), einschließlich Geräteeinstellungen, verwendetes Luciferase-Substrat und Nachweis geeigneter Lumineszenzmessungen basierend auf der in Anlage 3 beschriebenen Kontrollprüfung;
- angewandtes Verfahren zum Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung der Prüfmethode (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung der Prüfmethode im Zeitverlauf.

Prüfverfahren

- Anzahl der Wiederholungen und verwendeten Replikate
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationsverfahren und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung der angewandten Studienakzeptanzkriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Testverfahren.

Ergebnisse

- Tabellarische Darstellung der I_{\max} -, $EC_{1,5}$ - und Viabilitätswerte (d. h. IC_{50} , IC_{30}), die für die Prüfchemikalie und die Positivkontrolle bei jeder Wiederholung ermittelt

wurden, sowie der Mittelwerte (I_{\max} : Durchschnitt; $EC_{1,5}$ - und Viabilitätswerte: geometrisches Mittel) und Standardabweichung, die anhand der Daten aus allen einzelnen Wiederholungen berechnet wurden, und Angabe der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;

- ermittelter Variationskoeffizient bei den Lumineszenz-Messwerten für die Negativ-Kontrolle bei jedem Versuch;
- Diagramm zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven für die Induktion der Luciferase-Aktivität und Viabilität;
- Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

Erörterung der Ergebnisse

- Erörterung der Ergebnisse aus dem KeratinoSensTM-Test;
- Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

Schlussfolgerung

LITERATURHINWEISE

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fünfte überarbeitete Ausgabe, UN New York und Genf, 2013. Verfügbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.
- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.
- (4) Kapitel B.42 dieses Anhangs: Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest.
- (5) Kapitel B.6 dieses Anhangs: Sensibilisierung der Haut.
- (6) Kapitel B.50 dieses Anhangs: Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest: DA.
- (7) Kapitel B.51 dieses Anhangs: Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest: BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 ff. Verfügbar unter: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 ff. Verfügbar unter: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 63, 489-504.
- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.

- (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. in *Toxicology in Vitro*, 27, 1220-1225.
- (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1969.
- (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (Technical Report Nr. 87).
- (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
- (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
- (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 213, OECD, Paris.
- (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris, Frankreich.
- (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 S.

<http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>

Anlage 1

DEFINITIONEN

AOP (Adverse Outcome Pathway): Abfolge von Vorgängen, ausgehend von der chemischen Struktur einer Zielchemikalie oder Zielgruppe ähnlicher Chemikalien, über den molekularen auslösenden Vorgang bis hin zu einem In-vivo-Ergebnis von Interesse (2).

ARE: Antioxidant Response Element (auch als EpRE (*elektrophile Response Element*) bezeichnet), ist ein Response-Element, das in der vorgelagerten Promoterregion vieler zytoprotektiven und Phase-II-Gene anzutreffen ist. Bei Aktivierung durch Nfr2 steuert es die transkriptionelle Induktion dieser Gene.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

EC_{1,5}: Interpolierte Konzentration bei einer 1,5-fachen Induktion der Luciferase-Aktivität.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorhanden ist.

Empfindlichkeit: Anteil aller positiven/aktiven Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt klassifiziert werden. Dies ist ein Maß der Genauigkeit für eine Prüfmethode, die zu kategorischen Ergebnissen führt, und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode (29).

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Gemisch oder Lösung aus zwei oder mehr Stoffen, die nicht miteinander reagieren (1).

Genauigkeit: Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (29).

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien

(Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

Gültige Prüfmethode: Eine Prüfmethode, die eine ausreichende Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck aufweist und auf wissenschaftlich fundierten Grundsätzen beruht. Eine Prüfmethode ist niemals gültig im absoluten Sinn, sondern nur in Bezug auf einen festgelegten Zweck (29).

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – Integrierter Test- und Bewertungsansatz): Strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbewertung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Chemikaliengruppe, bei dem alle maßgeblichen Daten strategisch integriert und gewichtet werden, um als Grundlage für fundierte regulatorische Entscheidungen über potenzielle Gefahren und/oder Risiken und/oder die Notwendigkeit weiterer gezielter und somit minimaler Testungen herangezogen zu werden.

IC₃₀: Konzentration, die eine Verringerung der Zellviabilität um 30 % bewirkt.

IC₅₀: Konzentration, die eine Verringerung der Zellviabilität um 50% bewirkt.

I_{max}: Maximaler Induktionsfaktor der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur (Negativ-)Lösungsmittel-Kontrolle bei jeder Prüfchemikalienkonzentration.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1 ist ein Sensorprotein, durch das die Nrf2-Aktivität reguliert werden kann. Unter nicht induzierten Bedingungen wirkt das Keap1-Sensorprotein auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 für eine Ubiquitynylierung und den proteolytischen Abbau im Proteasom ein. Die kovalente Modifizierung der reaktiven Cysteinreste von Keap1 durch kleine Moleküle kann zur Nrf2-Dissoziation von Keap1 führen (8) (10) (11)).

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems, einschließlich des verwendeten Lösungsmittels, jedoch außer der Prüfchemikalie, enthält. Dies wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel aufgelöst wurden, zu bestimmen.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden sind. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei

oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 ist ein Transkriptionsfaktor, der am Antioxidant Response Pathway beteiligt ist. Wenn Nrf2 nicht ubiquitinyliert ist, baut es sich im Zytoplasma auf und transloziert in den Kern, wo es sich mit dem ARE in der vorgelagerten Promoterregion vieler zytoprotektiven Gene vereint, wobei deren Transkription initiiert wird (8) (10) (11).

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet das, was getestet wird.

Relevanz: Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Sie beinhaltet die Prüfung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (29).

Reproduzierbarkeit: Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen, die bei Prüfungen der gleichen Chemikalie bei einheitlichem Protokoll erzielt werden (siehe Zuverlässigkeit) (29).

Spezifität: Anteil aller negativen/inaktiven Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt klassifiziert werden. Dies ist ein Maß der Genauigkeit für eine Prüfmethode, die zu kategorischen Ergebnissen führt, und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode (29).

Stoff: Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität notwendigen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können (1).

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Variationskoeffizient: Kennwert der Varianz. Er wird für eine Gruppe replizierter Daten mittels Division der Standardabweichung durch den Mittelwert berechnet. Multipliziert mit 100 ergibt sich ein Prozentwert.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet (29).

Anlage 2

LEISTUNGSSTOFFE

In-vitro-Hautsensibilisierung: ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode

Vor der routinemäßigen Anwendung dieser Prüfmethode sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete KeratinoSens™-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Leistungsstoffe korrekt ermitteln und die EC_{1,5}- und IC₅₀-Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 10 Leistungsstoffe bestimmen. Diese Leistungsstoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite von Reaktionen im Hinblick auf die Gefahr einer Hautsensibilisierung repräsentieren. Weitere Auswahlkriterien waren kommerzielle Verfügbarkeit, Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und Verfügbarkeit hochwertiger In-vitro-Daten aus dem KeratinoSens™-Test.

Tabelle 1: Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim KeratinoSens™-Test

Leistungsstoffe	CAS-Nr.	Physikalischer Zustand	In-vivo-Vorhersage (1)	KeratinoSens™ Vorhersage (2)	EC _{1,5} (µM)-Referenzbereich (3)	IC ₅₀ (µM)-Referenzbereich (3)
Isopropanol	67-63-0	flüssig	Nicht-sensibilisator	negativ	> 1000	> 1000
Salicylsäure	69-72-7	fest	Nicht-sensibilisator	negativ	> 1000	> 1000
Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nicht-sensibilisator	negativ	> 1000	> 1000
Glyzerin	56-81-5	flüssig	Nicht-sensibilisator	negativ	> 1000	> 1000
Zimtalkohol	104-54-1	fest	Allergen (schwach)	positiv	25 - 175	> 1000
Ethylenglykoldimethacrylat	97-90-5	flüssig	Allergen (schwach)	positiv	5 - 125	> 500
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	fest	Allergen (mäßig)	positiv	25 - 250	> 500
Methyldibromglutaronitril	35691-65-7	fest	Allergen (stark)	positiv	< 20	20 - 100
4-Methylaminophenolsulfat	55-55-0	fest	Allergen (stark)	positiv	< 12,5	20 - 200
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	Allergen (extrem)	positiv	< 12,5	5 - 20

(1) Die Vorhersagen der In-vivo-Gefahr (und Potenz) basieren auf LLNA-Daten (13). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (24).

(2) Eine KeratinoSens™-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Nummer 9 und 11 dieser Prüfmethode in Betracht gezogen werden.

(3) Basierend auf den historischen beobachteten Werten (12).

Anlage 3

QUALITÄTSKONTROLLE BEI LUMINESZENZMESSUNGEN

Grundlagenversuch zur Gewährleistung optimaler Lumineszenzmessungen im KeratinoSens™-Test

Die drei folgenden Parameter sind von maßgeblicher Bedeutung, um zuverlässige Ergebnisse beim Luminometer zu erhalten:

- ausreichende Empfindlichkeit für einen stabilen Background in den Kontrollmulden;
- kein Gefälle entlang der Platte aufgrund langer Messzeiten;
- keine Lichtkontamination in benachbarten Zellen ausgehend von stark aktiven Mulden.

Vor der Prüfung sollte durch Prüfung eines Kontroll-Plattenaufbaus, wie unten beschrieben, sichergestellt werden, dass geeignete Lumineszenzmessungen durchgeführt werden können (Dreifachanalyse).

Plattenaufbau des ersten Kontrollversuchs

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0,98	EGDMA 1,95	EGDMA 3,9	EGDMA 7,8	EGDMA 15,6	EGDMA 31,25	EGDMA 62,5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Leer

EGDMA = Ethylenglykoldimethacrylat (CAS Nr.: 97-90-5), eine stark induzierende Chemikalie

CA = Zimtaldehyd, positive Referenz (CAS Nr.: 104-55-2)

Bei der Qualitätskontrollanalyse sollte Folgendes nachgewiesen werden:

- eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung in Zeile D, wobei $I_{\max} > 20$ -facher Wert über Background (in den meisten Fällen werden I_{\max} -Werte zwischen 100 und 300 erreicht);
- keine Dosis-Wirkungs-Beziehung in Zeile C und E (kein Induktionswert über 1,5 (idealerweise nicht über 1,3) aufgrund möglicher Lichtkontamination, insbesondere neben stark aktiven Mulden in der EGDMA-Zeile);
- kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeilen A, B, C, E, F und G (d. h. kein Gefälle entlang der Platte);
- die Variabilität in einer der Zeilen A, B, C, E, F und G sowie in den DMSO-Mulden in Zeile H sollte unter 20 % liegen (d. h. stabiler Background).

B.61 Fluorescein-Leckage-Prüfmethode zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 460 (2012). Bei der Fluorescein-Leckage-Prüfmethode handelt es sich um eine In-vitro-Prüfmethode, die unter bestimmten Umständen und mit bestimmten Einschränkungen zur Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) als Stoffe mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung gemäß Definition im Globalen Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN-GHS) (Kategorie 1), in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen¹ (CLP) (Kategorie 1) und durch die US-Umweltschutzbehörde (EPA) (Kategorie I) eingesetzt werden kann (1) (2). Im Sinne dieser Prüfmethode sind Stoffe mit stark augenreizender Wirkung als Chemikalien definiert, die nach Applikation eine Gewebeschädigung im Auge verursachen, die nicht innerhalb von 21 Tagen ausheilt, oder eine massive Verschlechterung des Sehvermögens auslösen, während Stoffe mit augenverätzender Wirkung als Chemikalien definiert sind, die eine irreversible Gewebeschädigung im Auge verursachen. Diese Chemikalien werden in UN-GHS-Kategorie 1, EU-CLP-Kategorie 1 oder US-EPA-Kategorie I eingestuft.
2. Obwohl die FL-Prüfmethode den In-vivo-Kaninchenaugentest nicht absolut ersetzen kann, wird sie als Teil einer gestuften Prüfstrategie zu gesetzgeberischen Einstufungs- und Kennzeichnungszwecken empfohlen. Somit wird die FL-Prüfmethode als erster Schritt innerhalb eines Top-Down-Ansatzes zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung, insbesondere bei bestimmten Arten von Chemikalien (z. B. wasserlösliche Stoffe und Gemische), empfohlen (3) (4).
3. Gegenwärtig herrscht allgemeines Einvernehmen darüber, dass der In-vivo-Augentest (TM B.5 (5)) in absehbarer Zukunft nicht durch einen einzigen In-vitro-Augenreizungstest ersetzt werden kann, der in der Lage ist, das gesamte Spektrum an Reizungen für verschiedene Chemikalienklassen vorherzusagen. Allerdings kann der In-vivo-Augentest eventuell durch strategische Kombination verschiedener alternativer Prüfmethoden im

¹ Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

Rahmen einer (gestuften) Prüfstrategie ersetzt werden (4). Der Top-Down-Ansatz (4) sollte zum Einsatz kommen, wenn die vorliegenden Informationen darauf schließen lassen, dass eine Chemikalie ein hohes Reizungspotenzial besitzt.

4. Basierend auf dem Vorhersagemodell unter Nummer 35 können durch die FL-Prüfmethode Chemikalien innerhalb eines begrenzten Anwendungsbereichs ohne weitere Testung als Stoffe mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung (UN-GHS Kategorie 1, EU-CLP-Kategorie 1, US-EPA-Kategorie I) identifiziert werden. Gleiches wird für Gemische angenommen, obwohl Gemische bei der Validierung nicht verwendet wurden. Daher kann mithilfe der FL-Prüfmethode die augenverätzende/-reizende Wirkung von Chemikalien entsprechend der sequenziellen Prüfstrategie TM B.5 bestimmt werden (5). Jedoch müsste eine Chemikalie, die nach der FL-Prüfmethode nicht als Stoff mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung vorhergesagt wurde, mit einer oder mehreren weiteren Prüfmethoden (in vitro und/oder in vivo) geprüft werden, mit denen folgende Chemikalien identifiziert werden können: i) Chemikalien, die nach der FL-Prüfmethode in vitro falsch-negative Stoffe mit augenverätzender/-reizender Wirkung sind (UN-GHS Kategorie 1, EU-CLP-Kategorie 1, US-EPA-Kategorie I); ii) Chemikalien, die nicht als augenverätzend/-reizend eingestuft sind (UN-GHS „Keine Einstufung“, EU-CLP „Keine Einstufung“, US-EPA-Kategorie IV); und/oder iii) Chemikalien, die als Stoffe mit leichter/mäßiger augenreizender Wirkung eingestuft sind (UN-GHS-Kategorien 2A und 2B, EU-CLP-Kategorie 2, US-EPA-Kategorien II und III).
5. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte für die Beurteilung der potenziellen augenverätzenden oder -reizenden Wirkung einer Prüfchemikalie, gemessen als ihre Fähigkeit, an einem impermeablen, konfluenten epithelialen Monolayer eine Schädigung hervorzurufen. Die Integrität der transepithelialen Permeabilität ist eine wichtige Funktion eines Epithels, das beispielsweise in der Bindehaut und Hornhaut zu finden ist. Die transepitheliale Permeabilität wird durch verschiedene undurchlässige Verbindungen (*Tight Junctions*) kontrolliert. Es wurde nachgewiesen, dass eine Zunahme der Permeabilität des Hornhautepithels in vivo mit der Entzündungsaktivität und Oberflächenschädigung, die mit fortschreitender Augenreizung zu beobachten sind, im Zusammenhang steht.
6. In der FL-Prüfmethode werden die toxischen Wirkungen nach kurzer Exposition gegenüber der Prüfchemikalie anhand einer Zunahme der Permeabilität für Fluorescein-Natrium durch das epitheliale Monolayer von Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen, die auf permeablen Inserts kultiviert werden, bestimmt. Die auftretende Fluorescein-Leckage ist proportional zu der von der Chemikalie induzierten Schädigung an den *Tight Junctions*, desmosomalen Verbindungen und Zellmembranen. Anhand der Leckagemenge kann das augentoxische Potenzial einer Prüfchemikalie geschätzt werden. Anlage 1 zeigt ein Diagramm von auf einer Insertmembran kultivierten Zellen für die FL-Prüfmethode.
7. Definitionen sind Anlage 2 zu entnehmen.

VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

8. Diese Prüfmethode basiert auf dem INVITTOX-Protokoll Nr. 71 (6), das in einer internationalen Validierungsstudie des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (ECVAM) in Zusammenarbeit mit dem US-amerikanischen Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) und dem Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) bewertet wurde.
9. Die FL-Prüfmethode wird weder zur Identifizierung von Chemikalien empfohlen, die als Chemikalien mit leichter/mäßiger Reizwirkung eingestuft werden sollten, noch von Chemikalien, die nicht als augenreizend eingestuft werden sollten (Stoffe und Gemische) (d. h. GHS-Kat. 2A/2B, „keine Einstufung“; EU-CLP-Kat. 2, „keine Einstufung“; US-EPA-Kat. II/III/IV), wie durch die Validierungsstudie nachgewiesen (3) (7).
10. Die Prüfmethode ist nur an wasserlöslichen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) anwendbar. Durch die FL-Prüfmethode wird das stark augenreizende Potenzial von Chemikalien, die wasserlöslich sind und/oder bei denen die toxische Wirkung nicht durch Verdünnung verändert wird, in der Regel exakt vorhergesagt (7). Um eine Chemikalie als wasserlöslich unter Versuchsbedingungen einzustufen, sollte sie in einer sterilen calciumhaltigen (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM), phenolrotfreien Hanks-Salzlösung (*Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS) mit einer Konzentration von ≥ 250 mg/ml löslich sein (eine Dosis über der Schwelle von 100 mg/ml). Ist die Prüfchemikalie jedoch unter der Konzentration 100 mg/ml löslich, bewirkt aber bereits eine FL-Induktion von 20 % bei dieser Konzentration (was bedeutet: $FL_{20} < 100$ mg/ml), kann sie dennoch in GHS-Kat. 1 oder EPA-Kat. I eingestuft werden.
11. Aufgrund der anerkannten Einsatzgrenzen dieser Prüfmethode sind starke Säuren und Basen, Zellfixierlösungen und stark flüchtige Chemikalien aus dem Anwendungsbereich ausgeschlossen. Diese Chemikalien weisen Mechanismen auf, die von der FL-Prüfmethode nicht gemessen werden, z. B. übermäßige Koagulation, Verseifung oder spezifische chemische Reaktionen. Andere anerkannte Einsatzgrenzen dieser Methode beruhen auf den Ergebnissen der Vorhersagefähigkeit bei gefärbten und viskosen Prüfchemikalien (7). Es ist zu beachten, dass beide Arten von Chemikalien nach kurzer Expositionsdauer schwer aus dem Monolayer zu entfernen sind und dass die Vorhersagefähigkeit der Prüfmethode verbessert werden könnte, wenn eine größere Anzahl von Spülschritten verwendet wird. Feste, in Flüssigkeit suspendierte Chemikalien neigen zu Ausfällung und die Endkonzentration, der die Zellen ausgesetzt sind, kann schwer zu bestimmen sein. Durch Ausschluss von Chemikalien dieser chemischen und physikalischen Klassen aus der Datenbank wird die Genauigkeit der FL-Prüfmethode bei den EU-, EPA- und GHS-Klassifizierungssystemen erheblich verbessert (7).

12. Basierend auf dem Zweck dieser Prüfmethode (Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung) sind Falsch-Negativ-Raten (siehe Nummer 13) unkritisch, da solche Chemikalien anschließend, je nach den gesetzlichen Anforderungen und unter Verwendung einer sequenziellen Prüfstrategie mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz (*weight-of-evidence approach*) (5) im Rahmen anderer angemessen validierter In-vitro-Tests oder an Kaninchen geprüft werden (siehe auch Nummern 3 und 4).
13. Andere anerkannte Einsatzgrenzen der FL-Prüfmethode beruhen auf Falsch-Negativ- und Falsch-Positiv-Raten. Bei Einsatz als erster Schritt innerhalb eines Top-Down-Ansatzes zur Identifizierung von wasserlöslichen Stoffen und Gemischen mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung (UN-GHS-Kategorie 1, EU-CLP-Kategorie 1, US-EPA-Kategorie I) lag die Falsch-Positiv-Rate der FL-Prüfmethode im Bereich von 7 % (7/103; UN-GHS und EU-CLP) bis 9 % (9/99; US-EPA) und die Falsch-Negativ-Rate im Bereich von 54 % (15/28; US-EPA) bis 56 % (27/48; UN-GHS und EU-CLP) im Vergleich zu den In-vivo-Ergebnissen. Chemikaliengruppen, die bei der FL-Prüfmethode zu Falsch-Positiv- und/oder Falsch-Negativ-Ergebnissen führen, werden hier nicht definiert.
14. Einige technische Einsatzgrenzen sind für die MDCK-Zellkultur spezifisch. Die *Tight Junctions*, die die Passage des Fluorescein-Natrium-Farbstoffs durch den Monolayer hemmen, werden mit steigender Zellpassagenzahl zunehmend beschädigt. Die unvollständige Ausbildung der *Tight Junctions* führt zu einer verstärkten Fluorescein-Leckage in der unbehandelten Kontrolle. Daher muss eine zulässige maximale Leckage in den unbehandelten Kontrollen festgelegt werden (siehe Nummer 38: 0 % Leckage). Wie bei allen In-vitro-Tests besteht die potenzielle Möglichkeit, dass die Zellen im Laufe der Zeit eine Transformation durchlaufen, sodass die Passagenzahlbereiche für die Tests unbedingt angegeben werden müssen.
15. Der gegenwärtige Anwendungsbereich könnte in einigen Fällen ausgedehnt werden, aber erst nach Analyse eines erweiterten Datenbestands von untersuchten Prüfchemikalien, der vorzugsweise durch Testung zusammengetragen wurde (3). Diese Prüfmethode wird regelmäßig aktualisiert, um neue Informationen und Daten zu berücksichtigen.
16. Laboratorien, die diese Prüfmethode erstmals anwenden, sollen die in Anlage 3 genannten Leistungskemikalien verwenden. Laboratorien können diese Chemikalien verwenden, um ihre technische Kompetenz zur Durchführung der FL-Prüfmethode nachzuweisen, bevor sie FL-Testdaten zum Zwecke der vorschriftsmäßigen Gefahrenklassifizierung einreichen.

TESTPRINZIP

17. Die FL-Prüfmethode ist ein zellbasierter In-vitro-Zytotoxizitätstest an einem konfluenten Monolayer von tubulären MDCK CB997-Epithelzellen, die auf semipermeablen Inserts kultiviert wurden und den nicht proliferierenden Zustand des In-vivo-Hornhautepithels

abbilden. Die MDCK-Zelllinie ist gründlich erprobt und bildet *Tight Junctions* und desmosomale Verbindungen, die mit denjenigen auf der apikalen Seite des Bindehaut- und Hornhautepithels vergleichbar sind. Die *Tight Junctions* und desmosomalen Verbindungen verhindern in vivo, dass gelöste Stoffe und Fremdstoffe das Hornhautepithel durchdringen. Der Verlust der transepithelialen Impermeabilität aufgrund beschädigter *Tight Junctions* und desmosomaler Verbindungen ist eines der ersten Anzeichen einer chemikalieninduzierten Augenreizung.

18. Die Prüfchemikalie wird auf den konfluenten Zellenlayer auf der apikalen Seite des Inserts appliziert. Eine kurze Expositionszeit von einer Minute wird routinemäßig angewandt, um die normale Ausscheidungsrate bei Exposition am Menschen widerzuspiegeln. Ein Vorteil der kurzen Expositionszeit ist, dass wasserbasierte Stoffe und Gemische unverdünnt getestet werden können, falls sie nach der Expositionszeit einfach zu entfernen sind. Dies ermöglicht einen direkteren Vergleich der Ergebnisse mit den Wirkungen der Chemikalie beim Menschen. Die Prüfchemikalie wird dann entfernt und der nicht toxische, stark fluoreszierende Fluorescein-Natrium-Farbstoff wird 30 Minuten lang auf die apikale Seite des Monolayers appliziert. Die von der Prüfchemikalie hervorgerufene Schädigung an den *Tight Junctions* wird anhand der Fluorescein-Menge bestimmt, die während einer festgelegten Zeitdauer durch die Zellschicht dringt.
19. Die Menge an Fluorescein-Natrium-Farbstoff, die durch den Monolayer und die Insertmembran in eine festgelegte Lösungsmenge in der Mulde (in die der Fluorescein-Natrium-Farbstoff durchtritt) gelangt, wird durch spektrofluorometrische Messung der Fluorescein-Konzentration in der Mulde bestimmt. Die Menge der Fluorescein-Leckage (FL) wird bezogen auf die gemessene Fluoreszenzintensität (FI) aus zwei Kontrollen berechnet: einer Blindkontrolle und einer Maximal-Leckage-Kontrolle. Der Leckageprozentsatz und somit das Ausmaß der Schädigung an den *Tight Junctions* wird bezogen auf diese Kontrollen für jede der festgelegten Konzentrationen der Prüfchemikalie bestimmt. Dann wird der FL₂₀-Wert (d. h. die Konzentration, bei der es zu 20 % FL relativ zu dem erfassten Wert für den unbehandelten konfluenten Monolayer und Inserts ohne Zellen kommt) berechnet. Der FL₂₀-Wert (mg/ml) wird im Vorhersagemodell zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und schwer augenreizender Wirkung verwendet (siehe Nummer 35).
20. Der Erholungsfaktor ist ein wichtiger Teil des Toxizitätsprofils einer Prüfchemikalie, der auch im In-vivo-Augenreizungstest bewertet wird. Vorläufige Analysen haben ergeben, dass Daten zur Erholung (bis zu 72 h nach Exposition gegenüber der Chemikalie) die Vorhersagekapazität des INVITTOX-Protokolls 71 potenziell verbessern könnten, jedoch ist eine weitergehende Bewertung erforderlich, bei der zusätzliche, vorzugsweise aus weiteren Prüfungen ermittelte Daten von Vorteil wären (6). Diese Prüfmethode wird regelmäßig aktualisiert, um neue Informationen und Daten zu berücksichtigen.

VERFAHREN

Vorbereitung des Zellmonolayers

21. Das MDCK CB997-Zellmonolayer wird unter Verwendung von subkonfluenten Zellen hergestellt, die in Zellkulturflaschen in DMEM/F12-Nährstoffmischung (1x-Konzentrat mit L-Glutamin, 15 mM HEPES, Calcium (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM) und 10 % hitzeinaktiviertem FCS/FBS) kultiviert wurden. Wichtig ist, dass alle Medien/Lösungen, die im FL-Test verwendet werden, Calcium mit einer Konzentration zwischen 1,8 mM (200 mg/l) und 1,0 mM (111 mg/l) enthalten, um die Bildung und Integrität der *Tight Junctions* sicherzustellen. Die Anzahl der Zellpassagen sollte Gegenstand einer Kontrolle sein, damit eine gleichmäßige und reproduzierbare Bildung der *Tight Junctions* gewährleistet ist. Vorzugsweise sollten Zellen verwendet werden, die nach 3-30 Passagen ab dem Auftauen gewonnen wurden, da Zellen in diesem Bereich eine ähnliche Funktionalität aufweisen, was zur Reproduzierbarkeit der Testergebnisse beiträgt.
22. Vor Durchführung der FL-Prüfmethode werden die Zellen durch Trypsinisation aus der Flasche entnommen und zentrifugiert. Eine geeignete Menge an Zellen wird in die Inserts von 24-Mulden-Platten ausgesät (siehe Anlage 1). Zum Aussäen der Zellen sollten Inserts (12 mm Durchmesser) mit einer Zellulosemischester-Membran, einer Dicke von 80-150 µm und einer Porengröße von 0,45 µm verwendet werden. In der Validierungsstudie wurden Millicell-HA-Inserts (12 mm) verwendet. Die Eigenschaften des Insert- und Membrantyps sind wichtig, da sich diese auf das Zellwachstum und die Bindung der Chemikalie auswirken. Bestimmte Arten von Chemikalien können eine Bindung mit der Millicell-HA-Insertmembran eingehen, was die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen könnte. Es sollten Leistungskemikalien (siehe Anlage 3) verwendet werden, um die Gleichwertigkeit bei Verwendung anderer Membrane nachzuweisen.
23. Die Bindung der Chemikalie an die Insertmembran ist bei kationischen Chemikalien, wie beispielsweise Benzalkoniumchlorid, die von der geladenen Membran angezogen werden, häufiger anzutreffen (7). Durch die Bindung der Chemikalie an die Insertmembran kann sich die Dauer der Exposition gegenüber der Chemikalie verlängern, was zu einer Überschätzung des toxischen Potenzials der Chemikalie führt; andererseits kann sich aber auch die Leckage von Fluorescein durch das Insert physikalisch bedingt verringern, da das Färbemittel an die kationische, an die Insertmembran gebundene Chemikalie gebunden wird, was wiederum zu einer Unterschätzung des toxischen Potenzials der Chemikalie führt. Dies lässt sich überwachen, indem nur die Membran der höchsten Konzentration der geprüften Chemikalie ausgesetzt und dann Fluorescein-Natrium-Farbstoff bei normaler Konzentration während der Standarddauer beigegeben wird (ohne Zellkontrolle). Wenn der Fluorescein-Natrium-Farbstoff gebunden wird, hat die Insertmembran nach dem Abspülen des Prüfmaterials die Farbe Gelb. Daher müssen die Bindungseigenschaften der

Prüfchemikalie unbedingt bekannt sein, damit die Wirkung der Chemikalie auf die Zellen ausgewertet werden kann.

24. Durch die Beimpfung der Inserts mit den Zellen sollte zum Zeitpunkt der Exposition gegenüber der Chemikalie ein konfluenten Monolayer gewonnen worden sein. $1,6 \times 10^5$ Zellen sollten pro Insert beigegeben werden (400 μ l einer Zellsuspension mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml). Unter diesen Umständen wird ein konfluenten Monolayer in der Regel nach 96 Stunden in Kultur gewonnen. Die Inserts sollten vor der Beimpfung sichtgeprüft werden, um sicherzustellen, dass etwaige Schäden, die bei der unter Nummer 30 beschriebenen visuellen Kontrolle erfasst werden, der Handhabung zuzuschreiben sind.
25. Die MDCK-Zellkulturen sollten in Inkubatoren in einer befeuchteten Atmosphäre bei $5\% \pm 1\%$ CO_2 und $37 \pm 1^\circ\text{C}$ kultiviert werden. Die Zellen sollten nicht durch Bakterien, Viren, Mycoplasmen oder Pilze kontaminiert sein.

Applikation der Prüf- und Kontrollchemikalien

26. Für jede Versuchsdurchführung sollte eine frische Stammlösung der Prüfchemikalie hergestellt und nach der Zubereitung innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Die Prüfchemikalien sollten in einer calciumhaltigen (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM), phenolrotfreien Hanks-Salzlösung (HBSS) vorbereitet werden, um die Bindung von Serumproteinen zu vermeiden. Die Löslichkeit der Chemikalie bei 250 mg/ml in HBSS sollte vor der Prüfung bewertet werden. Wenn die Chemikalie bei dieser Konzentration 30 Minuten lang eine stabile Suspension oder Emulsion bildet (d. h. gleichförmig bleibt und sich nicht absetzt oder in mehrere Phasen trennt), kann HBSS als Lösungsmittel verwendet werden. Stellt sich jedoch heraus, dass die Chemikalie bei dieser Konzentration nicht in HBSS löslich ist, sollte die Verwendung anderer Prüfmethode anstelle des FL-Tests in Erwägung gezogen werden. Der Einsatz von leichtem Mineralöl als Lösungsmittel in Fällen, in denen die Chemikalie nachweislich nicht in HBSS löslich ist, sollte mit Bedacht geprüft werden, da keine ausreichenden Daten vorliegen, die eine Schlussfolgerung hinsichtlich der Leistungsfähigkeit des FL-Tests unter solchen Bedingungen zulassen.
27. Alle zu prüfenden Chemikalien werden in einer sterilen, calciumhaltigen (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM), phenolrotfreien HBSS aus der Stammlösung bei fünf festgelegten Konzentrationen, die auf Gewichts-/Volumenbasis verdünnt werden, hergestellt: 1, 25, 100, 250 mg/ml sowie eine unverdünnte oder gesättigte Lösung. Beim Prüfen einer festen Chemikalie sollte eine sehr hohe Konzentration von 750 mg/ml eingeschlossen werden. Bei dieser Konzentration muss für die Applikation auf die Zellen möglicherweise eine Direktverdrängerpipette verwendet werden. Wenn die ermittelte Toxizität zwischen 25 und 100 mg/ml liegt, sollten die folgenden zusätzlichen

Konzentrationen zweimal geprüft werden: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Der FL₂₀-Wert sollte aus diesen Konzentrationen abgeleitet werden, sofern die Akzeptanzkriterien erfüllt waren.

28. Die Prüfchemikalien werden nach Entfernung des Zellkulturmediums und zweimaliger Spülung mit steriler, warmer (37°C), calciumhaltiger (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM), phenolrotfreier HBSS auf den konfluenten Zellmonolayer appliziert. Zuvor wurden die Filter visuell auf bereits vorhandene Schäden kontrolliert, die fälschlicherweise potenziellen Unverträglichkeiten gegenüber Prüfchemikalien zugeschrieben werden könnten. Es sollten mindestens drei Replikate für jede Konzentration der Prüfchemikalie sowie für die Kontrollen bei der Durchführung verwendet werden. Nach einer Minute Exposition bei Zimmertemperatur sollte die Prüfchemikalie vorsichtig abgesaugt werden, der Monolayer zweimal mit steriler, warmer (37°C), calciumhaltiger (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM), phenolrotfreier HBSS abgespült und die Fluorescein-Leckage sofort bestimmt werden.
29. Bei jeder Durchführung sollten gleichzeitige Negativ- und Positivkontrollen verwendet werden, um nachzuweisen, dass die Monolayer-Integrität (Negativkontrolle) und die Empfindlichkeit der Zellen (Positivkontrolle) innerhalb eines festgelegten historischen Akzeptanzbereichs liegen. Als Positivkontrolle wird Brij 35 (CAS Nr. 9002-92-0) mit einer Konzentration von 100 mg/ml vorgeschlagen. Diese Konzentration sollte eine Fluorescein-Leckage von ungefähr 30 % bewirken (akzeptabler Bereich 20-40 % Fluorescein-Leckage, d. h. Beschädigung der Zellschicht). Die vorgeschlagene Negativkontrolle ist calciumhaltige (mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM), phenolrotfreie HBSS (unbehandelt, Blindkontrolle). Ferner sollte eine Maximal-Leckage-Kontrolle bei jeder Durchführung eingeschlossen sein, um die Berechnung von FL₂₀-Werten zu ermöglichen. Die Maximal-Leckage wird über ein Kontroll-Insert ohne Zellen bestimmt.

Bestimmung der Fluorescein-Permeabilität

30. Unmittelbar nach Entfernung der Prüf- und Kontrollchemikalien werden 400 µl einer 0,1-mg/ml-Fluorescein-Natrium-Lösung (0,01 % (w/v) in calciumhaltiger [mit einer Konzentration von 1,0-1,8 mM], phenolrotfreier HBSS) den Inserts beigegeben (z. B. Millicell-HA). Die Kulturen werden 30 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten. Am Ende der Inkubation mit Fluorescein werden die Inserts vorsichtig aus den Mulden entnommen. Jeder Filter wird visuell kontrolliert und etwaige Schäden, die eventuell während der Handhabung aufgetreten sind, werden protokolliert.
31. Die Menge an Fluorescein, die durch Monolayer und Insert gedrungen ist, wird in der Lösung bestimmt, die nach Entfernen der Inserts in den Mulden verblieben ist. Die Messungen werden in einem Spektrofluorometer bei einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 485 nm bzw. 530 nm durchgeführt. Die Empfindlichkeit des Spektrofluorometers sollte so eingestellt werden, dass die numerische Differenz zwischen

der maximalen FL (Insert ohne Zellen) und der minimalen FL (Insert mit konfluentem Monolayer, behandelt mit Negativkontrolle) am größten ist. Aufgrund der Unterschiede bei dem verwendeten Spektrofluorometer wird die Verwendung einer Empfindlichkeit vorgeschlagen, die eine Fluoreszenzintensität > 4000 bei der maximalen Fluorescein-Leckage-Kontrolle ergibt. Der maximale FL-Wert sollte nicht größer als 9999 sein. Die Fluoreszenzintensität bei maximaler Leckage sollte im linearen Bereich des verwendeten Spektrofluorometers liegen.

Interpretation der Ergebnisse und Vorhersagemodell

32. Die FL-Menge ist proportional zu der durch die Chemikalie hervorgerufenen Schädigung an den *Tight Junctions*. Der FL-Prozentsatz für jede geprüfte Konzentration der Chemikalie wird aus den FL-Werten berechnet, die für die Prüfchemikalie mit Bezug auf die FL-Werte aus der Negativkontrolle (Messwert aus dem konfluenten Monolayer der mit der Negativkontrolle behandelten Zellen) und einer maximalen Leckage-Kontrolle (Messwert für die FL durch ein Insert ohne Zellen) ermittelt wurden.

Mittlere Fluoreszenzintensität bei maximaler Leckage = x

Mittlere Fluoreszenzintensität bei 0 % Leckage (Negativkontrolle) = y

Die mittlere 100 % Leckage wird durch Subtraktion der mittleren 0 % Leckage von der mittleren maximalen Leckage ermittelt,

d. h. $x - y = z$

33. Die prozentuale Leckage für jede festgelegte Dosis wird durch Subtraktion der 0 % Leckage von der mittleren Fluoreszenzintensität der drei Replikatmesswerte (m) und Division dieses Werts durch die 100 % Leckage bestimmt, d. h. $\% FL = [(m-y) / z] \times 100\%$. Dabei sind:

m = mittlere Fluoreszenzintensität der drei Replikatmessungen für die verwendete Konzentration

$\% FL =$ Prozentsatz des Fluorescein, das durch die Zellschicht dringt

34. Für die Berechnung der Chemikalienkonzentration, die 20 % FL bewirkt, sollte folgende Gleichung herangezogen werden:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Dabei sind:

D = prozentuale Hemmung

A = prozentuale Schädigung (20 % Fluorescein-Leckage)

B = prozentuale Fluorescein-Leckage < A

C = prozentuale Fluorescein-Leckage > A

M_C = Konzentration (mg/ml) von C

M_B = Konzentration (mg/ml) von B

35. Der FL₂₀-Grenzwert für die Vorhersage von Chemikalien als Stoffe mit augenverätzender/schwer augenreizender Wirkung ist nachfolgend angegeben:

FL₂₀ (mg/ml)	UN-GHS E&K	EU-CLP E&K	US-EPA E&K
≤ 100	Kategorie 1	Kategorie 1	Kategorie I

E&K: Einstufung und Kennzeichnung

36. Die FL-Prüfmethode wird nur für die Identifizierung von wasserlöslichen Stoffen mit augenverätzender oder schwer augenreizender Wirkung empfohlen (UN-GHS-Kategorie 1, EU-CLP-Kategorie 1, US-EPA-Kategorie I) (siehe Nummern 1 und 10).
37. Zur Identifizierung von wasserlöslichen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) (3) (6) (7) als Stoff mit schwer augenschädigender Wirkung (UN-GHS/EU-CLP-Kategorie 1) oder als Stoff mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung (US-EPA-Kategorie I) sollte die Prüfchemikalie einen FL₂₀-Wert von ≤ 100 mg/ml induzieren.

Akzeptanz der Ergebnisse

38. Der mittlere maximale Fluorescein-Leckage-Wert (x) sollte größer 4000 (siehe Nummer 31) sein, der mittlere 0 % Leckage-Wert (y) kleiner-gleich 300 sein und der mittlere 100 %-Leckage-Wert (z) zwischen 3700 und 6000 liegen.
39. Eine Prüfung gilt als akzeptabel, wenn die Positivkontrolle 20 % bis 40 % Schädigung an der Zellschicht verursacht hat (gemessen als prozentuale Fluorescein-Leckage).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

40. Je Versuchsdurchführung sollten die Daten von einzelnen Replikat-Mulden (z. B. Fluoreszenzintensitätswerte und berechnete prozentuale FL-Werte für jede Prüfchemikalie, einschließlich Einstufung) in tabellarischer Form angegeben werden. Darüber hinaus sollten die Mittelwerte \pm Standardabweichung von einzelnen Replikatmessungen angegeben werden.

Prüfbericht

41. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollchemikalien

- chemische Bezeichnung(en) wie der vom Chemical Abstracts Service (CAS) benutzte strukturelle Name, gefolgt von anderen Bezeichnungen, soweit bekannt;
- CAS-Nummer der Chemikalie, soweit bekannt;
- Reinheit und Zusammensetzung des Stoffs oder Gemischs (in Gewichtsprozent), soweit diesbezügliche Informationen vorliegen;
- physikalisch-chemische Eigenschaften, soweit sie für die Studie relevant sind (z. B. physikalischer Zustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, Stabilität, Wasserlöslichkeit, Chemikalienklasse);
- Behandlung der Prüf-/Kontrollchemikalien vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Lagerbedingungen:

Rechtfertigung der Prüfmethode und des verwendeten Protokolls

- Dies sollte Überlegungen in Bezug auf Anwendungsbereich und Einsatzgrenzen der Prüfmethode umfassen.

Prüfbedingungen

- Beschreibung des verwendeten Zellsystems, einschließlich Echtheitszeugnis und Mycoplasma-Status der Zelllinie;
- Details des angewandten Prüfverfahrens;
- verwendete Konzentration(en) der Prüfchemikalie;
- Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie;
- Dauer der Inkubation mit Fluorescein;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Testverfahren;
- Beschreibung der angewandten Bewertungskriterien;
- Verweis auf historische Daten des Modells (z. B. Negativ- und Positivkontrollen, Referenzchemikalien, soweit zutreffend);
- Informationen über die nachgewiesene technische Kompetenz des Labors.

Ergebnisse

- tabellarische Darstellung der Daten von einzelnen Prüfchemikalien und Kontrollen für jede Versuchsdurchführung und Replikatmessung (einschließlich individueller Ergebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen);
- abgeleitete Einstufung(en) mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien;
- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;

Erörterung der Ergebnisse

- Dies sollte Überlegungen bezüglich eines nicht aussagekräftigen Ergebnisses (Nummer 35: $FL_{20} > 100$ mg/ml) und weitere Prüfungen umfassen.

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

- (1) UN (2009), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), dritte überarbeitete Auflage, New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter:
[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
- (4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9
- (5) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.
- (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italien: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Verfügbar unter:
[<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
- (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
- (8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

Anlage 1

DIAGRAMM VON MDCK -ZELLEN, DIE AUF EINER INSERTMEMBRAN FÜR DIE FL-PRÜFMETHODE KULTIVIERT WURDEN

Eine konfluente Schicht von MDCK-Zellen wird auf der semipermeablen Membran eines Inserts kultiviert. Die Inserts werden in die Mulden von 24-Mulden-Platten eingesetzt.

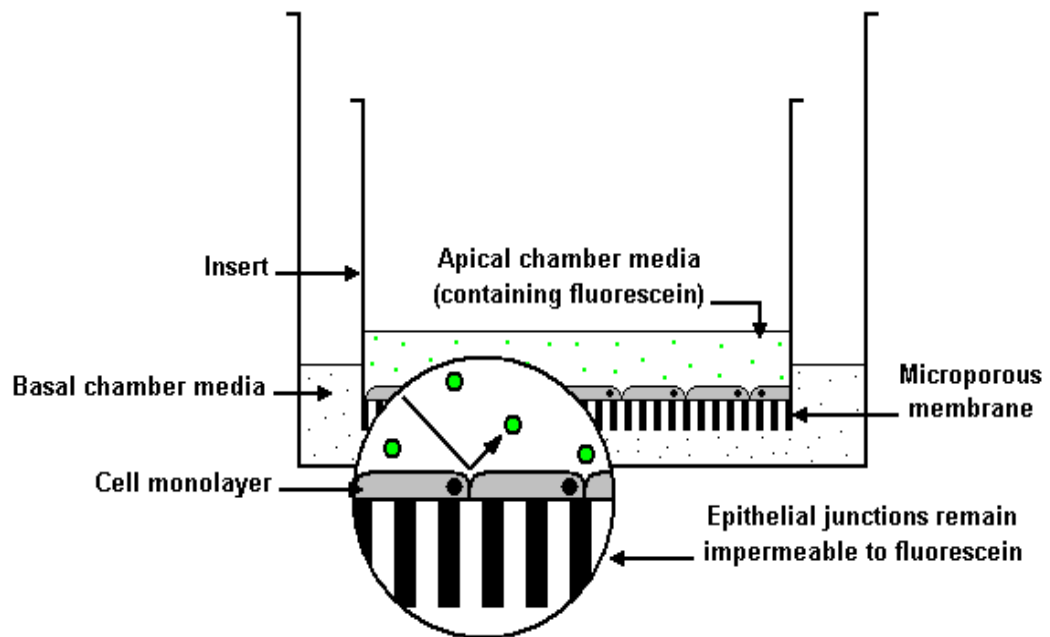


Abbildung entnommen aus: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

Anlage 2

DEFINITIONEN

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Empfindlichkeit: Anteil aller positiven/aktiven Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt klassifiziert werden. Dies ist ein Maß der Genauigkeit für eine Prüfmethode, die zu kategorischen Ergebnissen führt, und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode (8).

EPA-Kategorie I: Chemikalien mit verätzender Wirkung (irreversible Schädigung des Augengewebes) oder Hornhautkomplikation oder -reizwirkung, die länger als 21 Tage anhält (2).

Ersatzprüfung: Eine Prüfung, die eine routinemäßig angewandte Prüfung zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll und die im Vergleich zur akzeptierten Prüfung nachweislich in allen denkbaren Prüfsituationen und mit allen Chemikalien einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier oder der Umwelt gewährleistet, je nachdem, was zutrifft.

EU CLP (Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen): Umsetzung des UN-GHS-Systems zur Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) in der Europäischen Union (EU).

Evidenzbasierte Bewertung: Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial einer Chemikalie entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller positiven Chemikalien, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Sie ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller negativen Chemikalien, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Sie ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

FL₂₀: Kann durch Bestimmung der Konzentration geschätzt werden, bei der die geprüfte Chemikalie 20 % Fluorescein-Leckage durch die Zellschicht bewirkt.

Fluorescein-Leckage: Fluorescein-Menge, die durch die Zellschicht dringt, spektrofluorometrisch gemessen.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Wird im UN-GHS verwendet und bezeichnet ein Gemisch oder eine Lösung aus zwei oder mehr Stoffen, die nicht miteinander reagieren.

Genauigkeit: Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz“. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode.

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahrenklassifizierung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen zugeordnet werden kann, sind keine weiteren Testungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden kann.

GHS (Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN)): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten.

GHS-Kategorie 1: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind.

Leistungskemikalien: Teilmenge der Referenzchemikalien, die von einem Labor verwendet werden können, um seine Kompetenz hinsichtlich der validierten Referenzprüfmethode nachzuweisen.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Komponenten eines Testsystems enthält, einschließlich des Lösungsmittels oder Vehikels, und die mit den prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben

Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden, zu bestimmen. Bei der Testung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Testsystem interagiert.

Negativkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält. Diese Probe wird mit prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Testsystem interagiert.

Nicht eingestuft: Chemikalien, die nicht als Stoffe mit augenreizender Wirkung der UN-GHS-Kategorien 1, 2A oder 2B, der EU-CLP-Kategorien 1 oder 2 oder der US-EPA-Kategorien I, II oder III eingestuft sind.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einer Chemikalie behandelt wird, die bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Relevanz: Beschreibung der Beziehung zwischen dem Test und der untersuchten Wirkung und ob der Test aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Die Relevanz gibt an, inwieweit der Test die untersuchte biologische Wirkung richtig misst oder vorhersagt. Die Relevanz beinhaltet die Prüfung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (8).

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind.

Spezifität: Anteil aller negativen/inaktiven Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt klassifiziert werden. Dies ist ein Maß der Genauigkeit für eine Prüfmethode, die zu kategorischen Ergebnissen führt, und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode.

Stoff: Wird im UN-GHS verwendet und bezeichnet chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität notwendigen Zusatzstoffe und der bei der Herstellung entstehenden Verunreinigungen, mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Stoff mit augenreizender Wirkung: a) Chemikalie, die nach Applikation auf die

Vorderfläche des Auges eine reversible Augenschädigung verursacht; b) Chemikalien, die als Stoffe mit augenreizender Wirkung der UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B, der EU-CLP-Kategorie 2 oder der US-EPA-Kategorien II oder III eingestuft sind.

Stoff mit augenverätzender Wirkung: a) Chemikalie, die das Augengewebe irreversibel schädigt; b) Chemikalien, die als Stoffe mit augenreizender Wirkung der UN-GHS-Kategorie 1, der EU-CLP-Kategorie 1 oder der US-EPA-Kategorie I eingestuft sind.

Stoff mit stark augenreizender Wirkung: a) Chemikalie, die nach Applikation auf die Vorderfläche des Auges das Augengewebe derart schädigt, dass die Schädigung nicht innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation des Stoffs zurückgeht oder dass das Sehvermögen schwer beeinträchtigt ist; b) Chemikalien, die als Stoffe mit augenreizender Wirkung der UN-GHS-Kategorie 1, der EU-CLP-Kategorie 1 oder der US-EPA-Kategorie I eingestuft sind.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (8).

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und Intralabor-Wiederholbarkeit bewertet.

Anlage 3

LEISTUNGSCHEMIKALIEN FÜR DIE FL-PRÜFMETHODE

Vor der routinemäßigen Anwendung dieser Prüfmethode sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz nachweisen, indem sie die in Tabelle 1 empfohlenen acht Chemikalien in die richtige Augenschädigungsklasse einstufen. Diese Chemikalien wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite der lokalen Augenreizungen/-verätzungen repräsentieren, die auf den Ergebnissen des In-vivo-Kaninchenaugentests (TG 405, TM B.5 (5)) (d. h. den Kategorien 1, 2A, 2B oder „Keine Einstufung“ gemäß UN-GHS) basieren. Angesichts der validierten Zweckmäßigkeit des FL-Tests (d. h. zur Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung) lässt sich die Leistungsfähigkeit lediglich anhand von zwei Testergebnissen zu Einstufungszwecken (verätzend/stark reizend oder nicht verätzend/nicht stark reizend) nachweisen. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Chemikalien im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und das Vorhandensein hochwertiger Daten aus der FL-Prüfmethode. Aus diesem Grund wurden die Leistungsschemikalien aus der Publikation *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8) ausgewählt, die zur retrospektiven Validierung der FL-Prüfmethode herangezogen wurde.

Tabelle 1: Empfohlene Chemikalien für den Nachweis der technischen Kompetenz von Laboratorien zur Durchführung des FL-Tests

Chemikalie	CAS-Nr.	Chemikalien- klasse¹	Physika- lischer Zustand	<i>In-vivo</i>- Klassifizierung²	<i>In-vitro</i>- Klassifizierung³
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumverbindung	flüssig	Kategorie 1	Verätzend/stark reizend
Promethazin-Hydrochlorid	58-33-3	Amin/Amidin, heterocyclisch, organische Schwefelverbindung	fest	Kategorie 1	Verätzend/stark reizend
Natriumhydroxid (10 %)	1310-73-2	Alkali	flüssig	Kategorie 1	Verätzend/stark reizend
Natrium-laurylsulfat (15 %)	151-21-3	Carbonsäure (Salz)	flüssig	Kategorie 1	Verätzend/stark reizend
4-Carboxy-Benzaldehyd	619-66-9	Carbonsäure, Aldehyd	fest	Kategorie 2(A)	Nicht verätzend/nicht stark reizend
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Anorganisches Salz	fest	Kategorie 2(A)	Nicht verätzend/nicht stark reizend
Ethyl-2-methylaceto-acetat	609-14-3	Ketone, Ester	flüssig	Kategorie 2(B)	Nicht verätzend/nicht stark reizend
Glyzerin	56-81-5	Alkohol	flüssig	Keine Einstufung	Nicht verätzend/nicht stark reizend

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des *Chemical Abstracts Service*

¹ Jede Prüfchemikalie wurde anhand einer Standard-Klassifizierungsregelung auf Basis des Klassifizierungssystems der National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) einer Chemikalienklasse zugeordnet (abrufbar über <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

² Gestützt auf Ergebnisse aus dem In-vivo-Kaninchenaugentest (OECD TG 405, TM B.5) unter Verwendung von UN-GHS und EU-CLP.

³ Gestützt auf Ergebnisse aus dem FL-Test (INVITTOX-Protokoll Nr. 71 (6))

B.62 Alkalischer In-vivo-Comet-Assay an Säugetierzellen

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 489 (2016). Der alkalische In-vivo-Comet-Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese (*Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE)) (im Folgenden „Comet-Assay“) wird für die Erkennung von DNA-Strangbrüchen in Zellen oder Zellkernen eingesetzt, die aus Geweben von Tieren, gewöhnlich Nagern, isoliert wurden, die potenziell toxischen Stoffen ausgesetzt wurden. Der Comet-Assay wurde überprüft, und verschiedene Expertengruppen haben Empfehlungen abgegeben (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Es wurde ein OECD-Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen dieser Prüfrichtlinien enthält (11).
2. Der Comet-Assay dient zum Nachweis von Chemikalien, die DNA-Schäden auslösen. Durch den Comet-Assay können unter alkalischen Bedingungen (> pH 13) Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden, die beispielsweise auf direkte Interaktionen mit der DNA, alkali-labile Stellen oder transiente DNA-Strangbrüche aufgrund einer DNA-Exzisionsreparatur zurückzuführen sind. Diese Strangbrüche können repariert werden, ohne dass eine anhaltende Wirkung eintritt, können tödlich für die Zelle sein oder können zu einer Mutation führen, die eine dauerhafte lebensfähige Veränderung bewirkt. Zudem können sie Chromosomenschäden hervorrufen, die mit vielen Erkrankungen des Menschen, darunter auch Krebs, im Zusammenhang stehen.
3. Eine formale Validierungsstudie des In-vivo-Comet-Assays an Nagetieren wurde 2006-2012 unter Koordinierung des Japanischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (JaCVAM) in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (ECVAM) und den US-amerikanischen Validierungszentren *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) und *NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM) durchgeführt (12). Diese Prüfmethode berücksichtigt die empfohlenen Einsatzbereiche und Einsatzgrenzen des Comet-Assays und basiert auf dem bei der Validierungsstudie angewandten Schlussprotokoll (12) sowie auf weiteren einschlägigen veröffentlichten und unveröffentlichten (laboreigenen) Daten.
4. Die Definitionen der Schlüsselbegriffe sind Anlage 1 zu entnehmen. Es ist zu beachten, dass für diesen Assay viele verschiedene Plattformen eingesetzt werden können (Objektträger, Gelproben, 96-Mulden-Platten usw.). Zur Vereinfachung wird im Folgenden der Begriff „Objektträger“ verwendet, wobei aber alle anderen Plattformen darin eingeschlossen sind.

VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

5. Der Comet-Assay ist eine Methode zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen in eukaryotischen Zellen. In Agarose eingebettete Einzelzellen/Zellkerne auf einem Objektträger werden mit Detergenzien und hoher Salzkonzentration lysiert. Durch diesen Lyseschnitt werden die Zell- und Zellkernmembrane zerstört, sodass die spiralisierten DNA-Schleifen (allgemein als Nukleoide bezeichnet) und die DNA-Fragmente freigelegt werden können. Die Elektrophorese bei hohem pH-Wert führt zu kometartigen Strukturen, die bei Verwendung geeigneter Farbstoffe unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden können; die DNA-Fragmente wandern je nach Größe vom „Kopf“ in den „Schweif“ und die Intensität des Kometenschweifs relativ zur Gesamtintensität (Kopf plus Schweif) entspricht dem Grad des DNA-Bruchs (13) (14) (15).
6. Der alkalische In-vivo-Comet-Assay ist insbesondere für die Bewertung der genotoxischen Wirkung relevant, da die Reaktionen im Rahmen des Assays von der In-vivo-ADME (*Absorption, distribution, metabolism and excretion*, Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung) sowie von DNA-Reparaturprozessen abhängig sind. Diese unterscheiden sich je nach Tierart, Gewebetyp und Art der DNA-Schädigung.
7. Zur Einhaltung der Tierschutzanforderungen, insbesondere zur Verringerung der Verwendung von Versuchstieren (3R-Prinzip: *Replace, Reduce, Refine* - Vermeiden, Verringern, Verbessern) kann dieser Test auch mit anderen toxikologischen Studien, z. B. Toxizitätsstudien mit wiederholter Verabreichung (10) (16) (17), integriert werden oder der Endpunkt kann mit anderen genotoxischen Endpunkten, wie beispielsweise dem In-vivo-Erythrozyten-Mikrokerntest bei Säugern, kombiniert werden (18) (19) (20). Der Comet-Assay wird überwiegend an Nagetieren durchgeführt, wurde aber auch bei anderen Säugetier- und Nichtsäugetierarten angewandt. Die Verwendung von Nichtnagetierarten sollte im Einzelfall wissenschaftlich und ethisch begründet werden. Es wird dringend empfohlen, den Comet-Assay an anderen Arten als Nagetieren nur im Rahmen einer anderen Toxizitätsstudie und nicht als eigenständigen Test durchzuführen.
8. Expositionspfad und zu untersuchende Gewebe sollten basierend auf allen verfügbaren/vorliegenden Informationen über die Prüfchemikalien, z. B. beabsichtigter/erwarteter Expositionspfad beim Menschen, Metabolisierung und Verteilung, Potenzial für Wirkungen an Kontaktstellen, strukturelle Warnungen, andere Daten zur Genotoxizität oder Toxizität und Zweck der Studie, gewählt werden. Das genotoxische Potenzial der Prüfchemikalien kann daher gegebenenfalls im Zielgewebe bzw. in den Zielgeweben karzinogener und/oder anderer toxischer Wirkungen untersucht werden. Der Test gilt ferner als hilfreich für weitere Untersuchungen zur Genotoxizität, die in einem In-vitro-System nachgewiesen wurde. Es ist zweckmäßig, einen In-vivo-Comet-Assay an einem bestimmten Gewebe durchzuführen, wenn begründeterweise von einer entsprechenden Exposition des Gewebes ausgegangen werden kann.
9. Der Test wurde am ausführlichsten im Rahmen von Kooperationsstudien wie beispielsweise der JaCVAM-Studie (12) und in Rothfuss *et al.*, 2010 (10) am somatischen Gewebe

männlicher Ratten validiert. In der internationalen Validierungsstudie von JaCVAM wurden Leber und Magen verwendet. Die Leber, weil sie das aktivste Organ in der Metabolisierung von Chemikalien und häufig ein Zielorgan für Karzinogenität ist. Der Magen, weil er gewöhnlich die erste Kontaktstelle für Chemikalien nach oraler Aufnahme ist, obwohl andere Bereiche des Magen-Darm-Trakts wie Zwölffingerdarm und Dünndarm ebenfalls als Kontaktstellengewebe untersucht werden sollten und beim Menschen unter Umständen relevanter sind als der Drüsenmagen von Nagetieren. Es muss unbedingt darauf geachtet werden, dass solches Gewebe nicht übermäßig hohen Prüfchemikalienkonzentrationen ausgesetzt wird (21). Das Verfahren ist grundsätzlich bei allen Geweben anwendbar, von denen analysierbare Einzelzell-/Zellkernsuspensionen gewonnen werden können. Proprietäre Daten verschiedener Labors belegen die erfolgreiche Anwendung bei verschiedenen Geweben, und es liegen zahlreiche Publikationen vor, in denen die Anwendbarkeit des Verfahrens bei anderen Organen oder Geweben als Leber und Magen, z. B. Dünndarm (22), Niere (23) (24), Haut (25) (26) oder Harnblase (27) (28), Lunge und bronchoalveoläre Lavage-Zellen (relevant bei Untersuchungen zu eingeatmeten Chemikalien) (29) (30), aufgezeigt wurde. Ferner wurden Tests an mehreren Organen gleichzeitig durchgeführt (31) (32).

10. Obwohl die genotoxischen Wirkungen in Keimzellen durchaus von Interesse sein mögen, ist zu beachten, dass der standardmäßige alkalische Comet-Assay, der in der Prüfmethode beschrieben wird, für die Messung von DNA-Strangbrüchen in reifen Keimzellen als ungeeignet angesehen wird. Da im Rahmen einer Auswertung der Fachliteratur zum Einsatz des Comet-Assays bei der Untersuchung der Genotoxizität in Keimzellen von hohen und variablen Background-Werten der DNA-Schädigung berichtet wurde (33), werden Änderungen des Protokolls sowie verbesserte Standardisierungs- und Validierungsstudien für notwendig erachtet, bevor der Comet-Assay an reifen Keimzellen (z. B. Spermien) in die Prüfmethode aufgenommen werden kann. Darüber hinaus ist das Expositionsschema, das in dieser Prüfmethode beschrieben wird, nicht optimal. Für eine aussagekräftige Analyse der DNA-Strangbrüche in reifen Spermien wären längere Expositions- oder Probenahmezeiten erforderlich. Genotoxische Wirkungen, die durch den Comet-Assay in Hodenzellen in verschiedenen Differenzierungsstadien gemessen wurden, wurden in der Fachliteratur beschrieben (34) (35). Allerdings sollte beachtet werden, dass Gonaden eine Mischung aus somatischen und Keimzellen enthalten. Aus diesem Grund spiegeln positive Ergebnisse an einer Gonade (Hoden) nicht unbedingt eine Keimzellenschädigung wider, deuten aber darauf hin, dass die geprüfte(n) Chemikalie(n) und/oder ihre Metaboliten die Gonade erreicht haben.
11. Vernetzungen können mit den Standard-Versuchsbedingungen des Comet-Assays nicht zuverlässig identifiziert werden. Unter bestimmten geänderten Versuchsbedingungen könnten DNA-DNA- und DNA-Protein-Vernetzungen sowie sonstige Basenveränderungen wie beispielsweise oxidierte Basen erkannt werden (23) (36) (37) (38) (39). Jedoch wären weitere Arbeiten notwendig, um die notwendigen Protokolländerungen angemessen zu

charakterisieren. Daher ist der Nachweis von Vernetzungsmitteln nicht der primäre Zweck des hierin beschriebenen Tests. Der Test eignet sich, auch mit Änderungen, nicht zum Nachweis von Aneugenen.

12. Nach aktuellem Kenntnisstand hat der In-vivo-Comet-Assay verschiedene zusätzliche Einsatzgrenzen (siehe Anlage 3). Es wird davon ausgegangen, dass die Prüfmethode in Zukunft überprüft und gegebenenfalls angesichts der gewonnenen Erkenntnisse überarbeitet werden wird.
13. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Diese Überlegungen erübrigen sich, wenn die Durchführung von Tests für das Gemisch gesetzlich vorgeschrieben ist.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

14. Die Prüfchemikalie wird den Tieren über einen geeigneten Applikationsweg verabreicht. Dosierung und Probenahme sind unter den Nummern 36-40 ausführlich beschrieben. Zu den ausgewählten Probenahmezeitpunkten werden die untersuchten Gewebe seziiert und Einzelzell-/Zellkernsuspensionen hergestellt (In-situ-Perfusion kann vorgenommen werden, sofern sie als sinnvoll angesehen wird, z. B. Leber) und in Softagar eingebettet, um sie auf Objektträgern zu immobilisieren. Die Zellen/Zellkerne werden mit Lysepuffer behandelt, um die Zell- und/oder Zellkernmembran zu entfernen, und einer starken Lauge, z. B. $\text{pH} \geq 13$, ausgesetzt, um das „Entwinden“ der DNA und die Freisetzung der relaxierten DNA-Schleifen und -Fragmente zu ermöglichen. Die nukleare DNA im Agar wird dann der Elektrophorese unterzogen. Normale nichtfragmentierte DNA-Moleküle bleiben an der Stelle, an der sich die nukleare DNA im Agar befand, während fragmentierte DNA und relaxierte DNA-Schleifen zur Anode wandern. Nach der Elektrophorese wird die DNA durch einen geeigneten fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht. Die Präparate sollten mikroskopisch und mittels voll- oder halbautomatischer Bildanalyseysteme untersucht werden. Der Umfang der DNA-Wanderung bei der Elektrophorese und der Migrationsabstand entsprechen der Menge und Größe der DNA-Fragmente. Beim Comet-Assay gibt es verschiedene Endpunkte. Es wurde empfohlen, den DNA-Inhalt im Schweif (% DNA im Schweif oder % Schweif-Intensität) zur Bewertung der DNA-Schädigung heranzuziehen (12) (40) (41) (42). Nach der Analyse einer ausreichenden Anzahl von Zellkernen werden die Testergebnisse mit geeigneten Analysemethoden analysiert.
15. Es ist zu beachten, dass Änderungen verschiedener Aspekte der Methodik, einschließlich Vorbereitung der Proben, Elektrophoresebedingungen, visuelle Analyseparameter (z. B. Farbstoffintensität, Lichtintensität der Mikroskoplampe und Einsatz von Mikroskopfiltern

und Kameradynamik), und der Umgebungsbedingungen (z. B. Hintergrundbeleuchtung), untersucht wurden und sich auf die DNA-Wanderung auswirken können (43) (44) (45) (46).

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG DES LABORS

16. Jedes Labor sollte seine experimentelle Kompetenz in Bezug auf den Comet-Assay belegen, indem es seine Fähigkeit zur Herstellung von Einzelzell- oder Zellkernsuspensionen von ausreichender Qualität für jedes Zielgewebe und jede verwendete Tierart nachweist. Die Qualität der Zubereitungen wird in erster Linie anhand des prozentualen DNA-Anteils im Schweif bei mit Vehikel behandelten Tieren bewertet, deren Werte in einen reproduzierbaren niedrigen Bereich fallen. Die aktuellen Daten deuten darauf hin, dass der prozentuale DNA-Anteil im Schweif im Gruppenmittel (basierend auf dem Mittelwert der Mediane – Erläuterungen zu diesen Begriffen unter Nummer 57) in der Rattenleber vorzugsweise 6 % nicht überschreiten sollte, was mit den Werten aus der JaCVAM-Validierungsstudie (12) sowie aus anderen veröffentlichten und proprietären Daten im Einklang stehen würde. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt liegen nicht genügend Daten vor, um Empfehlungen für optimale oder akzeptable Bereiche bei anderen Geweben abzugeben. Dies schließt die Verwendung anderer Gewebe, sofern gerechtfertigt, nicht aus. Der Prüfbericht sollte eine Beurteilung der Leistung des Comet-Assays bei diesen Geweben unter Bezugnahme auf die veröffentlichte Literatur oder proprietäre Daten beinhalten. Erstens ist ein niedriger prozentualer DNA-Anteil im Schweif in den Kontrollen wünschenswert, um eine hinreichend dynamische Bandbreite für den Nachweis einer positiven Wirkung zu gewährleisten. Zweitens sollte jedes Labor die erwarteten Reaktionen für direkte Mutagene und Promutagene für verschiedene Wirkungsweisen gemäß den Beispielen in Tabelle 1 (Nummer 29) reproduzieren können.
17. Beispielsweise können positive Stoffe aus der JaCVAM-Validierungsstudie (12) oder anderen veröffentlichten Daten (siehe Nummer 9), gegebenenfalls mit Begründung, ausgewählt werden, wobei die eindeutigen positiven Wirkungen in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Zudem sollte die Fähigkeit zum Nachweis von schwachen Wirkungen bekannter Mutagene, wie z. B. niedrig dosiertem EMS, nachgewiesen werden, indem beispielsweise Dosis-Wirkungs-Beziehungen an einer hinreichenden Anzahl von Dosierungen mit entsprechendem Abstand aufgestellt werden. Anfänglich sollte sich das Labor auf den Nachweis der Kompetenz bei den am häufigsten verwendeten Geweben (z. B. Rattenleber) konzentrieren, wobei ein Vergleich zwischen vorliegenden Daten und erwarteten Ergebnissen angestellt werden könnte (12). Die Daten von anderen Geweben wie z. B. Magen, Zwölffingerdarm, Dünndarm, Blut usw. könnten gleichzeitig erfasst werden. Das Labor muss seine Kompetenz für sämtliche Gewebe aller Tierarten, die untersucht werden sollen, nachweisen und aufzeigen, dass eine akzeptable

positive Reaktion bei einem bekannten Mutagen (z. B. EMS) im jeweiligen Gewebe erreicht werden kann.

18. Vehikel-/Negativkontrolldaten sollten erfasst werden, um die Reproduzierbarkeit negativer Reaktionen nachzuweisen und sicherzustellen, dass die technischen Aspekte des Assays vorschriftsmäßig kontrolliert wurden, oder darauf hinzuweisen, dass historische Kontrollbereiche erneut festgelegt werden sollten (siehe Nummer 22).
19. Es ist zu beachten, dass das Labor, da mehrere Gewebe bei der Sektion gewonnen und für die Comet-Analyse aufgearbeitet werden können, in der Lage sein muss, mehrere Gewebe von einem einzelnen Tier zu gewinnen und somit sicherzustellen, dass keine potenzielle DNA-Läsion verloren geht und die Comet-Analyse nicht beeinträchtigt wird. Die Zeitdauer zwischen der Tötung des Tiers und der Gewinnung der Gewebe zur Aufbereitung kann kritisch sein (siehe Nummer 44).
20. Da bei der Entwicklung der Kompetenz für diesen Test Tierschutzbelange berücksichtigt werden müssen, können Gewebe von in anderen Tests verwendeten Tieren zur Entwicklung der Kompetenz bei den verschiedenen Aspekten des Tests eingesetzt werden. Darüber hinaus muss während der verschiedenen Phasen der Etablierung einer neuen Prüfmethode in einem Labor nicht unbedingt eine vollständige Studie durchgeführt werden. Ferner können weniger Tiere oder Prüfkonzentrationen bei der Entwicklung der notwendigen Fähigkeiten verwendet werden.

Historische Kontrolldaten

21. Im Verlauf der Untersuchungen zum Nachweis der Kompetenz sollte das Labor eine Datenbank mit historischen Daten aufbauen, um Positiv- und Negativkontrollbereiche und -verteilungen für die betreffenden Gewebe und Tierarten zu erfassen. Empfehlungen zur Erstellung und Verwendung historischer Daten (d. h. Kriterien für die Aufnahme und den Ausschluss von Daten in bzw. aus der Datenbank und die Akzeptanzkriterien für einen bestimmten Versuch) sind der Literatur zu entnehmen (47). Verschiedene Gewebe und Tierarten sowie verschiedene Vehikel und Verabreichungswege können unterschiedliche prozentuale Schweif-DNA-Werte in den Negativkontrollen ergeben. Daher müssen unbedingt Negativkontrollbereiche für jedes Gewebe und jede Tierart erfasst werden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder Xbar-Karten (48)), um zu ermitteln, wie variabel ihre Daten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor „unter Kontrolle“ ist. Die Auswahl der für Positivkontrollen geeigneten Stoffe, der Dosisbereiche und der Versuchsbedingungen (z. B. Elektrophoresebedingungen) muss zum Nachweis schwacher Wirkungen vielleicht ebenfalls optimiert werden (siehe Nummer 17).
22. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf ihre Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen Datenbanken historischer Kontrolldaten des Labors zu prüfen. Bei

größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank historischer Kontrolldaten erstellt werden.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorbereitungen

Auswahl der Tierart

23. In der Regel werden junge gesunde und geschlechtsreife Nagetiere üblicher Laborstämme verwendet (die bei Behandlungsbeginn 6 bis 10 Wochen alt sind, wenngleich etwas ältere Tiere auch zulässig sind). Die Auswahl der Nagetierarten sollte basieren auf i) Arten, die in anderen Toxizitätsstudien verwendet werden (um eine Korrelation zwischen den Daten herstellen zu können und integrierte Studien zu ermöglichen), ii) Arten, die in einer Kanzerogenitätsstudie Tumore entwickelt haben (bei der Untersuchung des Mechanismus der Karzinogenese) oder iii) Arten, deren Metabolismus dem des Menschen am ähnlichsten ist, soweit bekannt. In diesem Test werden routinemäßig Ratten verwendet, aber es können auch andere Arten zum Einsatz kommen, sofern dies ethisch und wissenschaftlich begründet ist.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

24. Bei Nagern soll die Temperatur im Versuchstierraum 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchte sollte bei 50 bis 60 % liegen, wenigstens 30 % betragen und außer bei Reinigung des Raumes 70 % vorzugsweise nicht übersteigen. Der Raum sollte künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden sollte. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfchemikalie gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird. Nagetiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen (maximal fünf pro Käfig) untergebracht werden, sofern kein aggressives Verhalten zu erwarten ist. Die Tiere sind nur dann einzeln zu halten, wenn dies wissenschaftlich begründet ist. Es sind möglichst feste Böden zu verwenden, da Maschendrahtböden Verletzungen verursachen können (49). Es muss für eine entsprechende Ausgestaltung des Lebensumfelds gesorgt werden.

Vorbereitung der Versuchstiere

25. Die Tiere werden den Kontroll- und Behandlungsgruppen nach dem Zufallsprinzip zugeordnet. Sie werden individuell gekennzeichnet und über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen vor Behandlungsbeginn unter Laborbedingungen eingewöhnt. Zur individuellen Kennzeichnung der Tiere muss eine minimalinvasive Methode gewählt

werden. Geeignete Methoden sind Anbringen von Ringen, Marken oder Mikrochips oder eine biometrische Identifizierung. Kupieren der Ohren oder Zehen ist bei diesen Tests wissenschaftlich nicht gerechtfertigt. Die Käfige sind so anzuordnen, dass sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere möglichst gering sein und nicht mehr als $\pm 20\%$ betragen.

Vorbereitung der Dosierung

26. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Vehikeln gelöst oder suspendiert oder dem Futter oder Trinkwasser beigemischt werden. Flüssige Prüfchemikalien können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Bei Exposition durch Inhalation können die Prüfchemikalien je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften als Gas, Dampf oder festes/flüssiges Aerosol verabreicht werden (50) (51).
27. Es sind frische Zubereitungen der Prüfchemikalie zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei Lagerung wird nachgewiesen und die entsprechenden Lagerbedingungen werden definiert.

Prüfbedingungen

Vehikel

28. Das Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit den Prüfchemikalien eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Vehikel verwendet, so sind Daten zu deren Kompatibilität in Bezug auf Versuchstiere, Verabreichungsweg und Endpunkt beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Es ist zu beachten, dass einige Vehikel (insbesondere zähflüssige Vehikel) Entzündungen hervorrufen und die Background-Werte der DNA-Strangbrüche an der Kontaktstelle, insbesondere bei mehrfachen Verabreichungen, erhöhen können.

Kontrollen

Positivkontrollen

29. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sollte jeder Versuch eine Gruppe von mindestens drei analysierbaren Tieren eines Geschlechts oder je Geschlecht, sofern beide Geschlechter verwendet werden (siehe Nummer 32), die mit einem Positivkontrollstoff behandelt wurden, umfassen. Möglicherweise kann die Eignung künftig adäquat nachgewiesen werden, sodass weniger Positivkontrollen erforderlich sind. Bei Verwendung mehrerer Probenahmezeitpunkte (z. B. bei Protokoll mit Einzelverabreichung) müssen nur bei einer Probenahme Positivkontrollen einbezogen werden. In einem solchen Fall sollte für einen

ausgewogenen Versuchsplan gesorgt werden (siehe Nummer 48). Die gleichzeitig als Positivkontrollen verwendeten Stoffe müssen nicht auf demselben Weg verabreicht werden wie die Prüfchemikalie. Allerdings ist es wichtig, dass bei der Messung der Wirkungen an Kontaktstellen derselbe Verabreichungsweg angewandt wird. Die Positivkontrollstoffe sollten nachweislich DNA-Strangbrüche in allen für die Prüfchemikalie untersuchten Geweben induzieren. EMS ist wahrscheinlich der am besten geeignete Positivkontrollstoff, da er in allen untersuchten Geweben DNA-Strangbrüche hervorgerufen hat. Die Dosierungen der Positivkontrollstoffe sollten jeweils so gewählt werden, dass mäßige Wirkungen für eine kritische Bewertung der Leistungsfähigkeit und Empfindlichkeit des Tests erreicht werden. Sie könnten auf Dosis-Wirkungs-Kurven beruhen, die das Labor während des Nachweises seiner Kompetenz aufgestellt hat. Der prozentuale DNA-Anteil im Schweiß bei Tieren, die gleichzeitig mit einer Positivkontrolle behandelt wurden, sollte mit dem vorab ermittelten Laborbereich für jedes Gewebe und jede Probenahmezeit für diese Tierart übereinstimmen (siehe Nummer 16). Beispiele für Positivkontrollstoffe und einige ihrer Zielgewebe (bei Nagern) sind Tabelle 1 zu entnehmen. In wissenschaftlich begründeten Fällen können auch andere als die in Tabelle 1 genannten Stoffe ausgewählt werden.

Tabelle 1: Beispiele für Positivkontrollstoffe und einige der jeweils zutreffenden Zielgewebe

Stoffe und CAS-Nr.
Ethylmethansulfonat (CAS-Nr. 62-50-0) für sämtliche Gewebe
Ethylnitrosoharnstoff (CAS-Nr. 759-73-9) für Leber und Magen, Zwölffingerdarm oder Dünndarm
Methylmethansulfonat (CAS-Nr. 66-27-3) für Leber, Magen, Zwölffingerdarm oder Dünndarm, Lunge oder bronchoalveoläre Lavage-Zellen, Niere, Harnblase, Lunge, Hoden und Knochenmark/Blut
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin (CAS-Nr. 70-25-7) für Magen, Zwölffingerdarm oder Dünndarm
1,2-Dimethylhydrazin-2HCl (CAS-Nr. 306-37-6) für Leber und Darm
<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosoharnstoff (CAS-Nr. 684-93-5) für Leber, Knochenmark, Blut, Niere, Magen, Dünndarm und Hirn.

Negativkontrollen

30. Jeder Versuch sollte für jede Probenahmezeit und jedes Gewebe eine Gruppe von Negativkontrolltieren umfassen, die nur mit dem Vehikel und ansonsten auf dieselbe Weise wie die Behandlungsgruppen behandelt wurden. Der prozentuale DNA-Anteil im Schweiß in den Negativkontrolltieren sollte innerhalb des vorab ermittelten Background-Bereichs des Labors für jedes Gewebe und jede Probenahmezeit für diese Tierart liegen (siehe Nummer 16). Liegen keine historischen oder veröffentlichten Kontrolldaten vor, aus denen hervorgeht, dass weder das gewählte Vehikel noch die Zahl der Verabreichungen oder der Verabreichungsweg schädliche oder genotoxische Wirkungen hervorruft, sollten

Vorversuche vor der Kompletstudie durchgeführt werden, um die Akzeptanz der Vehikelkontrolle nachzuweisen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Tiere

31. Obwohl nur wenige Daten über weibliche Tiere vorliegen, die bei einem Vergleich zwischen den Geschlechtern in Bezug auf den Comet-Assay herangezogen werden können, reagieren männliche und weibliche Tiere bei anderen In-vivo-Genotoxizitätstest in der Regel ähnlich, sodass die meisten Studien an beiden Geschlechtern durchgeführt werden könnten. Daten, aus denen nennenswerte Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren hervorgehen (z. B. Unterschiede in der systemischen Toxizität, im Stoffwechsel, in der Bioverfügbarkeit usw., einschließlich unter anderem eine Dosisfindungsstudie) legen die Verwendung von Tieren beider Geschlechter nahe. In diesem Fall kann es angebracht sein, eine Studie an männlichen und weiblichen Tieren durchzuführen, z. B. als Teil einer Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung. Gegebenenfalls ist die Verwendung eines faktoriellen Versuchsplans geeignet, wenn beide Geschlechter einbezogen werden. Einzelheiten zur Analyse der Daten bei Verwendung eines solchen Versuchsplans sind in Anlage 2 enthalten.
32. Zu Beginn der Studie (und während des Kompetenznachweises) sollten die Gruppengrößen so festgelegt werden, dass man pro Gruppe mindestens fünf analysierbare Tiere eines Geschlechts – oder je Geschlecht, sofern beide Geschlechter einbezogen werden – erhält (weniger in der gleichzeitigen Positivkontrollgruppe – siehe Nummer 29). Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten Pharmazeutika, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen. Bei einer gemäß den unter Nummer 33 festgelegten Parametern durchgeführten Studie mit drei Dosisgruppen und gleichzeitigen Negativ- und Positivkontrollgruppen (wobei jede Gruppe aus fünf Tieren desselben Geschlechts besteht) kann als Richtwert für die üblicherweise erforderliche Höchstmenge an Tieren eine Anzahl von 25 bis 35 Versuchstieren angegeben werden.

BEHANDLUNGSPLAN

33. Die Tiere sollten täglich über einen Zeitraum von mindestens zwei Tagen behandelt werden (d. h. zwei oder mehr Behandlungen in Abständen von ungefähr 24 Stunden), und die Probenahme sollte einmal 2 bis 6 Stunden (oder zum Zeitpunkt T_{\max}) nach der letzten Behandlung erfolgen (12). Proben aus verlängerten Verabreichungsschemata (z. B. tägliche Dosierung über 28 Tage) sind zulässig. Es wurde nachgewiesen, dass der Comet-Assay erfolgreich mit dem Erythrozyten-Mikrokerntest kombiniert werden kann (10) (19).

Jedoch sollte die Logistik im Zusammenhang mit Gewebeproben für die Comet-Analyse unter Berücksichtigung der Anforderungen an Gewebeproben für andere Arten von toxikologischen Bewertungen sorgfältig geplant werden. Die Probenahme 24 Stunden nach der letzten Verabreichung, was bei einer allgemeinen Toxizitätsstudie üblicherweise der Fall ist, ist in den meisten Fällen ungeeignet (siehe Nummer 40 zum Probenahmezeitpunkt). Die Anwendung anderer Behandlungs- und Probenahmepläne sollte begründet werden (siehe Anlage 3). Beispielsweise könnte eine Einzelbehandlung mit mehreren Probenahmen erfolgen, jedoch sollte in einem solchen Fall beachtet werden, dass bei einer Studie mit Einzelverabreichung mehrere Tiere benötigt werden, da mehrere Probenahmezeitpunkte erforderlich sind. Allerdings ist dies gelegentlich vorzuziehen, wenn beispielsweise die Prüfchemikalie eine übermäßige Toxizität nach wiederholter Verabreichung induziert.

34. Jede Art der Testdurchführung ist akzeptabel, solange die Prüfchemikalie eine positive Wirkung hervorruft oder im Falle einer Negativstudie die Exposition der Zielgewebe oder die Toxizität für diese Zielgewebe durch direkte oder indirekte Hinweise nachgewiesen wurde oder die Limit-Dosis erreicht wird (siehe Nummer 36).
35. Die Prüfchemikalien können auch in Form von zwei Teilmengen am selben Tag im Abstand von nicht mehr als 2 bis 3 Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Volumen handelt. In diesen Fällen sollte der Zeitpunkt der Probenahme ausgehend vom Zeitpunkt der letzten Verabreichung geplant werden (siehe Nummer 40).

Dosierungen

36. Wenn zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt wird, da keine geeigneten Daten aus anderen einschlägigen Studien zur Dosierungswahl vorliegen, sollte diese im selben Labor unter Verwendung von Tieren derselben Art und Rasse und desselben Geschlechts sowie nach demselben Behandlungsverfahren stattfinden, die nach den gegenwärtigen Ansätzen für die Durchführung von Dosisfindungsstudien in der Hauptstudie zu verwenden sind. Ziel der Studie sollte sein, die maximal verträgliche Dosis (MTD) zu ermitteln, die als die Dosis definiert ist, die für die Dauer der Studie zu leichten toxischen Wirkungen (z. B. eindeutige klinische Anzeichen wie Abweichungen in Verhalten oder Reaktionen, geringer Rückgang des Körpergewichts oder zytotoxische Wirkung auf ein Zielgewebe) führt, jedoch weder zum Tod führt noch Anzeichen von Schmerzen, Leiden oder Ängsten hervorruft, die eine Tötung erforderlich machen würden. Bei einer nicht toxischen Prüfchemikalie beträgt die Höchstdosis (Limit-Dosis) bei einem Behandlungszeitraum von mindestens 14 Tagen 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag. Bei Behandlungszeiträumen von weniger als 14 Tagen beträgt die Höchstdosis (Limit-Dosis) 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag. Bei bestimmten Arten von Prüfchemikalien (z. B. Humanarzneimittel), die spezifischen Vorschriften unterliegen, können andere Grenzwerte gelten.

37. Chemikalien, die eine Sättigung der toxikokinetischen Eigenschaften aufweisen oder Entgiftungsprozesse einleiten, die nach einer Langzeitgabe möglicherweise zu einem Rückgang der Exposition führen, entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden.
38. Bei der akuten und subakuten Version des Comet-Assays sollten neben der Höchstdosis (MTD, maximal mögliche Dosis, maximale Expositionsdosis oder Limit-Dosis) eine absteigende Folge von mindestens zwei zusätzlichen Dosierungen mit geeignetem Abstand (vorzugsweise weniger als $\sqrt{10}$) für jeden Probenahmezeitpunkt gewählt werden, um dosisbezogene Wirkungen nachzuweisen. Jedoch sollten die verwendeten Dosierungen vorzugsweise einen Bereich vom Höchstwert bis zu einer Dosierung, die wenig oder keine Toxizität erzeugt, abdecken. Werden bei allen untersuchten Dosierungen toxische Wirkungen im Zielgewebe beobachtet, sind weitere Untersuchungen bei nichttoxischen Dosierungen anzuraten (siehe Nummern 54 und 55). Studien, in denen der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve umfassender untersucht werden soll, erfordern gegebenenfalls weitere Dosisgruppen.

Verabreichung

39. Bei der Versuchsplanung ist der zu erwartende Expositionsweg beim Menschen zu berücksichtigen. Daher können mit entsprechender Begründung Verabreichungswege wie etwa eine Aufnahme über die Nahrung, über das Trinkwasser, eine topische, subkutane, intravenöse, orale (über eine Magensonde), intratracheale Verabreichung, durch Inhalation oder Implantation, gewählt werden. In jedem Fall sollte der Verabreichungsweg so gewählt werden, dass eine angemessene Exposition des/der Zielgewebe(s) sichergestellt ist. Eine intraperitoneale Injektion wird in der Regel nicht empfohlen, da sie keinen typischen Expositionsweg beim Menschen darstellt; sie sollte nur mit spezieller Begründung angewandt werden (z. B. bestimmte Stoffe, die als Positivkontrollen verwendet werden, zu Untersuchungszwecken oder für einige intraperitoneal verabreichte Arzneimittel). Die Höchstmenge an Flüssigkeit, die je Gabe über eine Magensonde oder eine Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht gezogen werden. Werden größere Volumina verwendet (sofern durch Tierschutzvorschriften erlaubt), ist dies zu begründen. Soweit möglich sollten verschiedene Dosierungen durch Anpassung der Konzentration der Dosisformulierung erreicht werden, um bei allen Dosen ein konstantes Volumen im Verhältnis zum Körpergewicht sicherzustellen.

Probenahmezeitpunkt

40. Der Probenahmezeitpunkt ist eine kritische Variable, da er von dem Zeitraum abhängt, der erforderlich ist, bis die Prüfchemikalien ihre maximale Konzentration im Zielgewebe

erreichen und DNA-Strangbrüche induziert werden; er muss jedoch vor dem Zeitpunkt liegen, zu dem diese Brüche entfernt oder repariert werden oder zum Zelltod führen. Die Persistenz einiger Läsionen, die zu den im Comet-Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüchen führen, kann sehr kurz sein, zumindest bei einigen in vitro geprüften Chemikalien (52) (53). Wenn solche transienten DNA-Läsionen vermutet werden, sollten Maßnahmen ergriffen werden, um deren Verlust zu verringern, indem sichergestellt wird, dass die Proben der Gewebe ausreichend früh, möglichst vor den nachfolgend angegebenen Standardzeiten, genommen werden. Die optimalen Probenahmezeitpunkte können chemikalien- oder pfadspezifisch sein, was z. B. zu einer raschen Gewebeexposition bei intravenöser Verabreichung oder bei Exposition durch Inhalation führt. Die Probenahmezeitpunkte sollten, sofern vorhanden, anhand von kinetischen Daten (z. B. Zeitpunkt (T_{\max}), zu dem die höchste Plasma- oder Gewebekonzentration (C_{\max}) erreicht wird oder im stabilen Zustand bei mehrfacher Verabreichung) bestimmt werden. Liegen keine kinetischen Daten vor, besteht ein akzeptabler Kompromiss für die Messung der Genotoxizität in der Probenahme 2 bis 6 Stunden nach der letzten Behandlung im Falle von zwei oder mehr Behandlungen oder 2 bis 6 und 16 bis 26 Stunden nach einer Einzelverabreichung. In einem solchen Fall ist jedoch darauf zu achten, dass alle Tiere gleichzeitig nach der letzten (oder einzigen) Dosis seziert werden. Ferner können Informationen über das Auftreten toxischer Wirkungen in Zielorganen (falls verfügbar) bei der Wahl geeigneter Probenahmezeitpunkte als Grundlage dienen.

Beobachtungen

41. Allgemeine klinische Beobachtungen in Bezug auf die Gesundheit der Tiere sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, vorgenommen und protokolliert werden (54). Mindestens zweimal täglich sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen. Bei länger andauernden Studien sollten alle Tiere mindestens einmal wöchentlich und am Ende des Prüfzeitraums gewogen werden. Die Futteraufnahme sollte bei jedem Futterwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Wenn die Prüfchemikalie über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme bei jedem Wasserwechsel und mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Tiere, die nicht letale Anzeichen übermäßiger Toxizität aufweisen, sollten vor Ende des Prüfzeitraums getötet werden und werden in der Regel nicht für die Comet-Analyse verwendet.

Gewebebegewinnung

42. Da die Induktion von DNA-Strangbrüchen (*Comets*) praktisch in jedem Gewebe untersucht werden kann, sollte die Begründung der Auswahl der zu gewinnenden Gewebe eindeutig definiert werden und auf dem Grund für die Durchführung der Studie sowie vorliegenden Daten zu ADME, Genotoxizität, Karzinogenität oder sonstiger Toxizität für

die untersuchte Prüfchemikalie beruhen. Wichtige zu berücksichtigende Faktoren sind der Verabreichungsweg (basierend auf dem bzw. den wahrscheinlichen Expositionspfaden beim Menschen), die vorhergesagte Resorption und Verteilung im Gewebe, die Rolle der Metabolisierung und der mögliche Wirkmechanismus der Prüfchemikalien. Die Leber ist das am häufigsten untersuchte Gewebe, für das auch die meisten Daten vorliegen. Wenn keine Hintergrundinformationen vorliegen und keine spezifischen zu untersuchenden Gewebe identifiziert werden, wäre daher eine Probenahme an der Leber gerechtfertigt, da sie ein primärer Ort des Metabolismus xenobiotischer Stoffe und häufig sowohl der/den ursprünglichen Chemikalie(n) als auch Metaboliten ausgesetzt ist. In einigen Fällen kann jedoch die Untersuchung einer direkten Kontaktstelle (z. B. bei oral verabreichten Chemikalien der Drüsenmagen oder Zwölffingerdarm/Dünndarm oder bei inhalierten Chemikalien die Lunge) am zweckmäßigsten sein. Zusätzliche oder alternative Gewebe sollten basierend auf den jeweiligen Gründen für die Durchführung des Versuchs gewählt werden. Allerdings kann es sinnvoll sein, mehrere Gewebe derselben Tiere zu untersuchen, vorausgesetzt, das Labor hat seine Kompetenz bei solchen Geweben sowie im Umgang mit mehreren Geweben gleichzeitig nachgewiesen.

Vorbereitung der Proben

43. Für die nachstehend (Nummern 44-49) beschriebenen Prozesse ist es wichtig, dass alle Lösungen oder stabilen Suspensionen vor ihrem Verfallsdatum verwendet oder bei Bedarf frisch zubereitet werden. In der nachfolgenden Beschreibung gelten die Zeiträume, um i) die einzelnen Gewebe nach der Sektion zu entnehmen, ii) die Gewebe in Zell-/Zellkernsuspensionen aufzuarbeiten und iii) die Suspension aufzuarbeiten und die Objektträger vorzubereiten, alle als kritische Variablen (siehe Definitionen in Anlage 1). Für jeden dieser Schritte sollte bei der Festlegung der Methode und beim Kompetenznachweis eine akzeptable Zeitdauer festgelegt worden sein.
44. Die Tiere werden im Einklang mit den einschlägigen Tierschutzvorschriften und nach dem 3R-Prinzip zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der letzten Behandlung mit einer Prüfchemikalie getötet. Die ausgewählten Gewebe werden entfernt und seziiert und ein Teil wird für den Comet-Assay gewonnen. Gleichzeitig sollte eine Sektion aus demselben Gewebeteil herausgeschnitten und für eine mögliche histopathologische Analyse (siehe Nummer 55) nach Standardmethoden (12) in eine Formaldehydlösung oder eine geeignete Fixierlösung gelegt werden. Das Gewebe für den Comet-Assay wird in einen Zerkleinerungspuffer gelegt, ausreichend mit kaltem Zerkleinerungspuffer gespült, um Restblut zu beseitigen, und bis zur Verarbeitung in eiskaltem Zerkleinerungspuffer aufbewahrt. Eine In-situ-Perfusion kann ebenfalls durchgeführt werden, z. B. bei Leber, Niere.
45. Es wurden zahlreiche Methoden für die Zell-/Zellkernisolierung veröffentlicht. Dazu gehören das Zerkleinern von Geweben wie beispielsweise Leber und Niere, das

Abschaben der Schleimhautoberflächen des Magen-Darm-Trakts, die Homogenisierung und die enzymatische Verdauung. In der JaCVAM-Validierungsstudie wurden lediglich isolierte Zellen untersucht. Um die Methode festzulegen und um zwecks Nachweis der Kompetenz auf die JaCVAM-Versuchsdaten Bezug nehmen zu können, werden isolierte Zellen bevorzugt. Jedoch wurde gezeigt, dass sich das Testergebnis bei Verwendung von isolierten Zellen oder von Zellkernen nicht wesentlich unterschied (8). Ferner führten unterschiedliche Methoden für die Isolierung der Zellen (z. B. Homogenisierung, Zerkleinerung, enzymatische Verdauung und Siebfiltration) zu vergleichbaren Ergebnissen (55). Folglich können entweder isolierte Zellen oder Zellkerne verwendet werden. Das Labor sollte die gewebespezifischen Methoden zur Einzelzell-/Zellkernisolierung sorgfältig prüfen und validieren. Wie bereits unter Nummer 40 erwähnt, kann die Persistenz einiger Läsionen, die zu den vom Comet-Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüchen führen, sehr kurz sein (52) (53). Daher ist es ungeachtet der Methode für die Zubereitung der Einzelzell-/Zellkernsuspensionen wichtig, dass die Gewebe möglichst bald nach Tötung der Tiere aufbereitet und unter Bedingungen aufbewahrt werden, die den Verlust der Läsionen verringern (z. B. durch Lagerung bei niedriger Temperatur). Die Zellsuspensionen sollten bis zur Verwendung eiskalt aufbewahrt werden, sodass die Abweichungen zwischen Proben minimal sind und angemessene Reaktionen bei den Positiv- und Negativkontrollen nachgewiesen werden können.

VORBEREITUNG DER OBJEKTTRÄGER

46. Die Objektträger sollten schnellstmöglich (im Idealfall innerhalb einer Stunde) nach Zubereitung der Einzelzell-/Zellkernsuspensionen vorbereitet werden. Die Temperatur und die Zeit zwischen der Tötung der Tiere und der Vorbereitung der Objektträger sollten eng kontrolliert und unter Laborbedingungen validiert werden. Durch das Volumen der Zellsuspension, das der Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (gewöhnlich 0,5-1,0 %) zur Vorbereitung der Objektträger beigegeben wird, sollte der Anteil der Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt nicht auf weniger als 0,45 % reduziert werden. Die optimale Zelldichte wird durch das Bildanalysesystem bestimmt, das zur Auswertung der Comets verwendet wird.

Lyse

47. Die Lysebedingungen stellen ebenfalls eine kritische Variable dar und können sich auf die Strangbrüche, die aus spezifischen Arten von DNA-Veränderungen resultieren (bestimmte Alkylierungen und Bildung von Addukten zu Basen der DNA), auswirken. Daher empfiehlt es sich, die Lysebedingungen bei allen Objektträgern innerhalb eines Versuchs so konstant wie möglich zu halten. Nach der Vorbereitung sollten die Objektträger mindestens eine Stunde (oder über Nacht) bei ungefähr 2-8 °C bei gedämpften Lichtverhältnissen (z. B. gelbes Licht (oder vor Licht geschützt)) zur Vermeidung einer

Exposition gegenüber weißem Licht, das UV-Komponenten enthalten kann, in gekühlte Lyselösung eingelegt werden. Nach dieser Inkubationszeit sollten die Objektträger abgespült werden, um vor der alkalischen Entwindung Detergenz- und Salzreste zu beseitigen. Dies kann unter Verwendung von gereinigtem Wasser, neutralisierender Pufferlösung oder Phosphat-Pufferlösung erfolgen. Elektrophorese-Pufferlösung kann ebenfalls verwendet werden. Dies würde die alkalischen Bedingungen in der Elektrophoresekammer erhalten.

Entwindung und Elektrophorese

48. Die Objektträger sollten nach dem Zufallsprinzip auf die Plattform einer Unterwasser-Elektrophoreseapparatur gesetzt werden, die so viel Elektrophoreselösung enthält, dass die Oberflächen der Objektträger vollständig bedeckt sind (die Höhe der Bedeckung sollte bei allen Versuchsdurchführungen gleich sein). Bei anderen Arten von Comet-Assay-Elektrophoreseapparaturen, z. B. mit aktiver Kühlung, Umwälzung und Hochleistungsnetzteil, führt eine höhere Bedeckung durch das Lösungsmittel zu einer höheren Stromstärke bei konstanter Spannung. Die Objektträger sollten nach einem ausgewogenen Versuchsplan in den Elektrophoresetank eingelegt werden, damit die Wirkungen von Trends oder Randeffekte im Tank abgeschwächt und Schwankungen zwischen den Chargen möglichst gering gehalten werden. Dies bedeutet, dass jede Elektrophorese-Versuchsdurchführung die gleiche Anzahl von Objektträgern von jedem in der Studie eingeschlossenen Tier und Proben aus den verschiedenen Dosisgruppen, Negativ- und Positivkontrollen umfassen sollte. Die Objektträger sollten mindestens 20 Minuten im Elektrophoresetank belassen werden, damit die DNA sich entwinden kann, und dann unter kontrollierten Bedingungen elektrophoretisch untersucht werden. Diese Bedingungen sollten eine optimale Empfindlichkeit und dynamische Bandbreite des Tests garantieren (d. h. zu akzeptablen Werten des prozentualen DNA-Anteil im Schweif bei Negativ- und Positivkontrollen zur Optimierung der Empfindlichkeit führen). Das Ausmaß der DNA-Wanderung steht im linearen Verhältnis zur Dauer der Elektrophorese sowie zum Potenzial (V/cm). Auf der Grundlage der JaCVAM-Studie könnte dies 0,7 V/cm bei mindestens 20 Minuten sein. Die Dauer der Elektrophorese wird als kritische Variable betrachtet, und die Elektrophoresezeit sollte so eingestellt werden, dass die dynamische Bandbreite optimiert wird. Längere Elektrophoresezeiten (z. B. 30 oder 40 Minuten zur Maximierung der Empfindlichkeit) bewirken bei bekannten Mutagenen in der Regel stärkere Positivreaktionen. Allerdings können längere Elektrophoresezeiten auch zu einer übermäßigen Wanderung in den Kontrollproben führen. Die Spannung sollte in jedem Versuch konstant und die Variabilität der anderen Parameter in einem schmalen, festgelegten Bereich gehalten werden. In der JaCVAM-Studie ergab beispielsweise ein Wert von 0,7 V/cm eine anfängliche Stromstärke von 300 mA. Die Tiefe der Pufferlösung sollte so eingestellt werden, dass die erforderlichen Bedingungen erreicht und während des gesamten Versuchs eingehalten werden. Die Stromstärke am Anfang und Ende der

Elektrophoresezeit sollte protokolliert werden. Daher sollten die optimalen Bedingungen während des anfänglichen Nachweises der Kompetenz im jeweiligen Labor bei jedem untersuchten Gewebe ermittelt werden. Die Temperatur der Elektrophoreselösung sollte während der Entwindung und Elektrophorese niedrig gehalten werden (in der Regel 2-10 °C) (10). Die Temperatur der Elektrophoreselösung am Anfang der Entwindung sowie am Anfang und Ende der Elektrophorese ist jeweils zu protokollieren.

49. Nach der Elektrophorese sollten die Objektträger mindestens 5 Minuten lang in die neutralisierende Pufferlösung eingelegt bzw. darin abgespült werden. Gele können angefärbt und „frisch“ (z. B. innerhalb von 1-2 Tagen) ausgewertet oder zur späteren Auswertung (z. B. innerhalb von 1-2 Wochen nach Anfärbung) dehydriert werden (56). Allerdings sollten die Bedingungen während des Nachweises der Kompetenz validiert und historische Daten für jede dieser Bedingungen gesondert erfasst und protokolliert werden. Im letzteren Fall sollten die Objektträger zur Dehydration mindestens 5 Minuten lang in reines Ethanol eingelegt, an der Luft getrocknet und bis zur Auswertung entweder bei Zimmertemperatur oder in einem Behälter in einem Kühlschrank aufbewahrt werden.

Messmethoden

50. Comets sollten mithilfe eines automatischen oder halbautomatischen Bildanalyse-Systems quantitativ ausgewertet werden. Die Objektträger werden mit einem geeigneten fluoreszierenden Farbstoff, z. B. SYBR Gold, Green I, Propidiumjodid oder Ethidiumbromid, angefärbt und mit geeigneter Vergrößerung (z. B. 200x) unter einem Mikroskop mit Epi-Fluoreszenz- und entsprechenden Detektoren oder mit einer Digitalkamera (z. B. CCD-Kamera) gemessen.
51. Die Zellen lassen sich, wie im *Atlas of Comet Assay Images* (57) beschrieben, in drei Kategorien einteilen, nämlich in auswertbar, nicht auswertbar und *Hedgehog* (weitere Ausführungen unter Nummer 56). Nur auswertbare Zellen (eindeutig definierter Kopf und Schweif, keine Interferenzen mit Nachbarzellen) sollten für den prozentualen DNA-Anteil im Schweif ausgewertet werden, um Artefakte zu vermeiden. Die Häufigkeit von nicht auswertbaren Zellen muss nicht angegeben werden. Die Häufigkeit von *Hedgehogs* sollte durch visuelle Auswertung (da das Fehlen eines klar definierten Kopfes bedeutet, dass sie mittels Bildanalyse nicht leicht erkannt werden) von mindestens 150 Zellen pro Probe (näheren Erläuterungen unter Nummer 56) bestimmt und gesondert dokumentiert werden.
52. Alle zu analysierenden Objektträger, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen, sollten vor der Analyse unabhängig kodiert und „blind“ ausgewertet werden, damit die Auswertung ohne Kenntnis der Behandlungsbedingungen erfolgt. Bei jeder Probe (pro Gewebe pro Tier) sollten mindestens 150 Zellen (ohne *Hedgehogs* – siehe Nummer 56) analysiert werden. Die Auswertung von 150 Zellen pro Tier bei mindestens fünf Tieren pro Dosis (weniger in der gleichzeitigen Positivkontrolle – siehe Nummer 29) gewährleistet entsprechend der Analyse von Smith *et al.*, 2008, (5) eine hinreichende

statistische Aussagekraft. Bei Verwendung von Objektträgern könnten dies zwei oder drei ausgewertete Objektträger pro Probe sein, wenn fünf Tiere pro Gruppe zum Einsatz kommen. Es sollten mehrere Bereiche des Objektträgers in einer solchen Dichte untersucht werden, dass eine Überschneidung von Schweifen ausgeschlossen ist. Die Auswertung am Rand der Objektträger ist zu vermeiden.

53. DNA-Strangbrüche im Comet-Assay können anhand von unabhängigen Endpunkten wie z. B. dem prozentualen DNA-Anteil im Schweif, der Schweiflänge und dem Schweifmoment gemessen werden. Sofern ein geeignetes Bildanalyzesystem verwendet wird, können alle drei Messungen durchgeführt werden. Jedoch wird der prozentuale DNA-Anteil im Schweif (auch als prozentuale Schweif-Intensität bezeichnet) für die Bewertung und Interpretation der Ergebnisse empfohlen (12) (40) (41) (42). Dieser Anteil wird anhand der DNA-Fragmentintensität im Schweif, ausgedrückt als Prozentsatz der Gesamtintensität der Zelle, bestimmt (13).

Gewebeschädigung und Zytotoxizität

54. Positive Ergebnisse im Comet-Assay sind möglicherweise nicht allein auf Genotoxizität zurückzuführen sein. Auch toxische Wirkungen im Zielgewebe können eine Zunahme der DNA-Wanderung hervorrufen (12) (41). Hingegen ist bei bekannten Genotoxinen häufig eine geringe oder mäßige Zytotoxizität zu beobachten (12), was zeigt, dass der Comet-Assay alleine keine Unterscheidung zwischen DNA-Wanderung, die durch Genotoxizität ausgelöst wird, und durch Zytotoxizität hervorgerufener DNA-Wanderung erlaubt. Wenn jedoch eine Zunahme der DNA-Wanderung beobachtet wird, wird empfohlen, eine Untersuchung auf einen oder mehrere Indikatoren für Zytotoxizität durchzuführen, da dies bei der Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein kann. Eine Zunahme der DNA-Wanderung ist bei Vorliegen eindeutiger Anzeichen von Zytotoxizität mit Vorsicht zu interpretieren.
55. Es wurden zahlreiche Messgrößen für die Zytotoxizität vorgeschlagen, wobei histopathologische Veränderungen als relevante Messgröße für Gewebetoxizität gelten. Beobachtungen wie Entzündung, Zellinfiltration, apoptotische oder nekrotische Veränderungen wurden mit einer Zunahme der DNA-Wanderung in Verbindung gebracht. Wie die JaCVAM-Validierungsstudie (12) gezeigt hat, gibt es jedoch keine endgültige Liste der mit einer Zunahme der DNA-Wanderung stets einhergehenden, histopathologischen Veränderungen. Änderungen bestimmter biologischer Parameter (z. B. AST, ALT) können ebenfalls nützliche Informationen über die Gewebeschädigung liefern, und ferner können zusätzliche Indikatoren wie z. B. Caspase-Aktivierung, TUNEL-Färbung, Annexin-V-Färbung usw. in Betracht gezogen werden. Allerdings wurden über die Verwendung dieser Indikatoren in In-vivo-Studien nur wenig Daten veröffentlicht, und nicht alle sind gleich zuverlässig.

56. *Hedgehogs* (oder *Clouds*, Geisterzellen) sind Zellen, deren mikroskopisches Bild einen kleinen oder nicht existenten Kopf und lange, diffuse Schweife zeigt und die als schwer beschädigte Zellen gelten, obwohl die Genese der *Hedgehogs* unsicher ist (siehe Anlage 3). Aufgrund ihres Aussehens sind Messungen des prozentualen Anteils der Schweif-DNA mittels Bildanalyse unzuverlässig, weshalb *Hedgehogs* gesondert zu bewerten sind. Das Auftreten von *Hedgehogs* sollte vermerkt und angegeben werden, und jede relevante Zunahme, bei der davon ausgegangen wird, dass sie auf die Prüfchemikalie zurückzuführen ist, ist zu untersuchen und mit Vorsicht zu interpretieren. Bei solchen Überlegungen kann die Kenntnis der potenziellen Wirkungsweise der Prüfchemikalien von Nutzen sein.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Behandlung der Ergebnisse

57. Die Versuchseinheit ist das Tier. Daher sollten sowohl die Daten für die einzelnen Tiere als auch die zusammengefassten Ergebnisse in tabellarischer Form dargestellt werden. Aufgrund der hierarchischen Art der Daten wird empfohlen, für jeden Objektträger den Median des prozentualen Anteils der Schweif-DNA zu bestimmen und für jedes Tier den Mittelwert der Mediane zu berechnen (12). Anschließend wird der Mittelwert aus den Mittelwerten für die einzelnen Tiere bestimmt, um den Gruppenmittelwert zu erhalten. Alle diese Werte sind in den Bericht aufzunehmen. Alternative Ansätze (siehe Nummer 53) können verwendet werden, sofern dies wissenschaftlich und statistisch begründet ist. Statistische Analysen können nach verschiedenen Ansätzen durchgeführt werden (58) (59) (60) (61). Bei der Auswahl der anzuwendenden statistischen Methoden sollte die Notwendigkeit einer Transformation (z. B. Logarithmus oder Quadratwurzel) der Daten und/oder der Addition einer kleinen Zahl (z. B. 0,001) zu allen Werten (auch Werten ungleich Null), wie in den obigen Referenzdokumenten erörtert, berücksichtigt werden, um die Wirkungen von Null-Zellwerten abzuschwächen. Nähere Informationen zur Analyse von Wechselwirkungen zwischen Behandlung und Geschlecht bei Verwendung beider Geschlechter sowie zur nachfolgenden Analyse der Daten, wenn Unterschiede bestehen oder keine Unterschiede festgestellt werden, sind Anlage 2 zu entnehmen. Daten zur Toxizität bei Tieren und klinische Anzeichen sind ebenfalls anzugeben.

Gültigkeitskriterien

58. Die Akzeptanz eines Versuchs beruht auf folgenden Kriterien:

- a. Die Daten der gleichzeitigen Negativkontrolle gelten als zulässig für die Aufnahme in die Datenbank des Labors mit historischen Negativkontrolldaten (siehe Nummer 16).

- b. Gleichzeitige Positivkontrollen (siehe Nummer 29) sollten Reaktionen hervorrufen, die mit denen kompatibel sind, die in der Datenbank mit historischen Positivkontrollen generiert werden und gegenüber den gleichzeitigen Negativkontrollen eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.
- c. Eine angemessene Zahl an Zellen und Dosierungen wurde analysiert (Nummer 52 und Nummern 36, 37 und 38).
- d. Die Kriterien für die Wahl der höchsten Dosierung stimmen mit den unter Nummer 36 beschriebenen überein.

Bewertung und Interpretation der Ergebnisse

59. Unter der Voraussetzung, dass alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn

- a. mindestens eine der Versuchsdosierungen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- b. ein geeigneter Trendtest zeigt, dass die Zunahme dosisabhängig ist,
- c. Ergebnisse außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten für eine bestimmte Tierart, ein Vehikel, einen Verabreichungsweg, ein Gewebe und eine bestimmte Anzahl von Verabreichungen liegen.

Sind alle diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie DNA-Strangbrüche in den in diesem Versuchssystem untersuchten Geweben auslösen kann. Sind nur ein oder zwei dieser Kriterien erfüllt, siehe Nummer 62.

60. Unter der Voraussetzung, dass alle Gültigkeitskriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn

- a. keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- b. ein geeigneter Trendtest zeigt, dass es keine dosisabhängige Zunahme gibt,
- c. alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten für eine bestimmte Tierart, ein Vehikel, einen Verabreichungsweg, ein Gewebe und eine bestimmte Anzahl von Verabreichungen liegen,
- d. eine Exposition der Zielgewebe oder die Toxizität für die Zielgewebe direkt oder indirekt nachgewiesen wurde.

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine DNA-Strangbrüche in den in diesem Versuchssystem untersuchten Geweben auslösen kann.

61. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.
62. In den Fällen, in denen die Reaktion, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist (d. h. nicht alle unter Nummer 59 oder 60 genannten Kriterien sind erfüllt), und um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung bewertet und/oder weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wenn dies wissenschaftlich begründet ist. Die Auswertung weiterer Zellen (soweit dies angebracht ist) oder die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter optimierten Versuchsbedingungen (z. B. Abstände der Dosierungen, andere Verabreichungswege, andere Probenahmezeitpunkte oder andere Gewebe), könnte hilfreich sein.
63. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen, so dass die Reaktion als nicht eindeutig eingestuft wird.
64. Um die biologische Relevanz eines positiven oder mehrdeutigen Ergebnisses zu bewerten, sind Informationen zur Zytotoxizität für das Zielgewebe erforderlich (siehe Nummern 54 und 55). Wenn lediglich im Falle von eindeutigen Anzeichen für zytotoxische Wirkungen positive oder mehrdeutige Ergebnisse beobachtet werden, würde die Studie als nicht eindeutig im Hinblick auf die Genotoxizität abgeschlossen werden, außer wenn genügend Informationen vorliegen, die eine endgültige Schlussfolgerung zulassen. Bei einem negativen Studienergebnis mit Anzeichen für Toxizität bei allen untersuchten Dosierungen sind weitere Untersuchungen bei nichttoxischen Dosierungen anzuraten.

Prüfbericht

65. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, sofern vorhanden;
- Stabilität der Prüfchemikalie, letztes Verwendungsdatum oder Datum für erneute Analyse, soweit bekannt.

Einkomponentige Substanz:

- Aussehen, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, falls zutreffend und praktisch durchführbar usw.

Mehrkomponentige Substanz, UVCB-Stoffe und Gemische:

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel/Vehikel:

- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;
- Zubereitung der Dosisformulierungen;
- analytische Bestimmungen der Formulierungen (z. B. Stabilität, Homogenität, nominale Konzentrationen).

Versuchstiere:

- verwendete Tierart/Rasse, wissenschaftliche und ethische Begründung für deren Wahl;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter, Ausgestaltung der Käfige usw.;
- individuelles Gewicht der Tiere am Anfang und am Ende des Versuchs, einschließlich Bereich, Mittelwert und Standardabweichung des Körpergewichts für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Ergebnisse einer Dosisfindungsstudie (falls durchgeführt);
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfchemikalie;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;

- Begründung des Verabreichungswegs;
- Injektionsstelle (bei Studien mit subkutaner oder intravenöser Verabreichung);
- Methoden für die Aufbereitung der Proben, falls verfügbar, histopathologische Analysen, insbesondere bei einer Chemikalie mit positiver Reaktion im Comet-Assay;
- Begründung der Gewebeauswahl;
- Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfchemikalie ins Zielgewebe oder in den allgemeinen Kreislauf gelangt ist, im Falle negativer Ergebnisse;
- tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), berechnet aus der Konzentration der Prüfchemikalie im Futter/Wasser (ppm) und der Futter- bzw. Wasseraufnahme, falls zutreffend;
- Angaben zu Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zu Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplänen und Begründungen der Wahl (z. B. toxikokinetische Daten, falls verfügbar);
- Schmerzlinderungs-, Analgesiemethode;
- Angaben zur Methode der humanen Tötung;
- Verfahren zur Isolierung und Konservierung der Gewebe;
- Methoden zur Zubereitung von Einzelzell-/Zellkernsuspensionen;
- Herkunft und Partienummern aller Reagenzien (soweit möglich);
- Methoden zur Bewertung der Zytotoxizität;
- Elektrophoresebedingungen;
- angewandte Anfärbemethoden und
- Methoden zur Auswertung und Messung von Comets.

Ergebnisse:

- gegebenenfalls allgemeine klinische Beobachtungen vor und während des Testzeitraums bei jedem Tier;
- Nachweise für Zytotoxizität, falls untersucht;

- bei Studien von mehr als einer Woche: individuelles Gewicht der Tiere während der Studie, einschließlich Bereich, Mittelwert und Standardabweichung des Körpergewichts für jede Gruppe; Futteraufnahme;
- gegebenenfalls Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- für jedes Gewebe/Tier prozentualer DNA-Anteil im Schweiß (oder andere Messwerte, falls ausgewählt) und Mediane pro Objektträger, Mittelwerte pro Tier und Mittelwerte pro Gruppe;
- gleichzeitige und historische Negativkontrolldaten mit Bereichen, Mittelwerten/Medianen und Standardabweichungen für jedes bewertete Gewebe;
- gleichzeitige und historische Positivkontrolldaten;
- für andere Gewebe als die Leber Dosis-Wirkungs-Kurve, einschließlich Positivkontrolle. Diese kann auf den während des Nachweises der Kompetenz erfassten Daten basieren (siehe Nummern 16 und 17). Ferner sollte mit Verweisen auf die aktuelle Literatur belegt werden, dass Größenordnung und Streuung der Reaktionen auf die Kontrollen bei diesem Gewebe angemessen sind;
- statistische Analysen und angewandte Methoden; Kriterien für die Einstufung einer Wirkung als positiv, negativ oder nicht eindeutig;
- Häufigkeit von *Hedgehogs* in jeder Gruppe und pro Tier.

Erörterung der Ergebnisse

Schlussfolgerung

Referenzdokumente

LITERATURHINWEISE

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, 206-21.
- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol. 702/1, 40-69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the*

detection of genotoxic carcinogens, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “Comet” assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, 86-94.
- (14) Tice, R.R., D.L. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, 207-14.
- (15) Collins, A.R. (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, 249-61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, 145–54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, 51-9.
- (23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, 28-41.

- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, 175-8.
- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, 26-30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, 51-9.
- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 681/1, 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, 275-282.

- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, 167-72.
- (37) Pfuhrer, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, 689-95.
- (44) Möller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, 113-23.

- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, 41-45.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Kapitel B.8 dieses Anhangs: *Prüfung auf subakute Toxizität nach Inhalation: 28-Tage-Test*.
- (51) Kapitel B.29 dieses Anhangs: *Prüfung auf subchronische Toxizität nach Inhalation: 90-Tage-Test*.
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, 35-41.
- (54) OECD (2002), “Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, 45–51.
- (57) *Atlas of Comet Assay Images*, Scientist Press Co., Ltd., Tokio, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, 167-75.

- (60)Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, 485-93.
- (61)Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, 171-82.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese: Empfindliches Verfahren zum Nachweis primärer DNA-Schädigungen auf Einzelzell-/Zellkernebene.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

Comet: Kometähnliche Form, die Nucleoide nach Einwirkung eines elektrophoretischen Felds annehmen: Der Kopf ist der Zellkern, und der Schweif wird durch die DNA gebildet, die aufgrund des elektrischen Felds aus dem Zellkern gewandert ist.

Kritische Variable/kritischer Parameter: Dies ist eine Protokollvariable, bei der sich eine kleine Änderung erheblich auf die Schlussfolgerung des Tests auswirken kann. Kritische Variablen können gewebespezifisch sein. Kritische Variablen sollten (insbesondere innerhalb eines Tests) nicht geändert werden, ohne zu prüfen, wie sich die Änderung auf die Assay-Reaktion auswirkt, wie beispielsweise durch die Größenordnung und Variabilität bei den Positiv- und Negativkontrollen angedeutet. Im Prüfbericht sollten Änderungen an kritischen Variablen, die während des Tests oder gegenüber dem Standardprotokoll des Labors vorgenommen wurden, angegeben und einzeln begründet werden.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Schweif-Intensität oder % DNA im Schweif: Dies entspricht der Intensität des Comet-Schweifs bezogen auf die Gesamtintensität (Kopf plus Schweif) und spiegelt den als Prozentsatz ausgedrückten Anteil der DNA-Schädigung wider.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Anlage 2

FAKTORIELLER VERSUCHSPLAN ZUR ERMITTLUNG GESCHLECHTSSPEZIFISCHER UNTERSCHIEDE BEIM IN-VIVO-COMET-ASSAY

Faktorieller Versuchsplan und Analyse

Bei diesem Versuchsplan werden mindestens fünf männliche und fünf weibliche Tiere je Konzentration getestet. Dies ergibt einen Versuch, bei dem mindestens 40 Tiere verwendet werden (20 männliche und 20 weibliche zzgl. entsprechender Positivkontrollen).

Der Versuchsaufbau, der zu den einfacheren faktoriellen Versuchsplänen zählt, entspricht einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, wobei Geschlecht und Konzentration die Hauptfaktoren sind. Die Daten können anhand vieler Standard-Statistiksoftwareanwendungen wie SPSS, SAS, STATA oder Genstat oder auch mit R analysiert werden.

Bei der Analyse wird die Varianz im Datensatz in die zwischen den Geschlechtern, die zwischen den Konzentrationen und die in Zusammenhang mit den Interaktionen zwischen den Geschlechtern und Konzentrationen partitioniert. Jeder der Terme wird anhand eines Schätzwerts der Varianz zwischen den Replikatversuchstieren innerhalb der gleichgeschlechtlichen Tiergruppen überprüft, die die gleiche Konzentration erhalten haben. Die zugrundeliegende Methodik ist in vielen Standardwerken zur Statistik (siehe Referenzdokumente) und in den in Statistiksoftware-Paketen mitgelieferten Hilfe-Funktionen im Einzelnen beschrieben.

Die Analyse erfolgt durch Prüfung des Terms der Interaktion „Geschlecht x Konzentration“ in der ANOVA-Tabelle¹. Liegt kein signifikanter Term für die Interaktion vor, ergeben die kombinierten Werte für beide Geschlechter oder mehrere Konzentrationen eine zulässige Grundlage für statistische Tests zwischen den Konzentrationen aufgrund des Terms der ANOVA für die Varianz der innerhalb eines solchen Gruppe zusammengefassten Werte.

Die Analyse wird fortgesetzt mit der Partitionierung der geschätzten Varianz zwischen den Konzentrationen in kontrastierende Klassen, die die Grundlage bilden für einen Test auf lineare und quadratische Abhängigkeit der Reaktionen bei den verschiedenen

¹ Statistiker, die mit einem Modellierungsansatz wie z. B. dem Ansatz der allgemeinen linearen Modelle (GLM) arbeiten, folgen bei der Analyse möglicherweise einem anderen, wenn auch vergleichbarem Ansatz, werden jedoch nicht notwendigerweise eine Herleitung der herkömmlichen ANOVA-Tabelle vornehmen, die auf algorithmische Lösungswege für statistische Berechnungen aus dem Vor-Computerzeitalter zurückgeht.

Konzentrationen. Liegt dagegen eine signifikante Interaktion „Geschlecht x Konzentration“ vor, so kann dieser Term auch in Gegenüberstellung der Interaktion „linear x Geschlecht“ und „quadratisch x Geschlecht“ partitioniert werden. Anhand dieser Terme kann geprüft werden, ob die Reaktionen auf die Konzentrationen bei beiden Geschlechtern parallel verlaufen oder ob die Geschlechter unterschiedlich reagieren.

Der Schätzwert für die Varianz der innerhalb der Gruppen zusammengefassten Werte kann als Grundlage für paarweise Tests zu Abweichungen zwischen den Mittelwerten dienen. Diese Vergleiche könnten zwischen den Mittelwerten für die beiden Geschlechter und zwischen den Mittelwerten für die verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden, beispielsweise um einen Vergleich mit den Negativkontrollen vorzunehmen. Bei signifikanter Interaktion können die Mittelwerte verschiedener Konzentrationen innerhalb eines Geschlechts oder die Mittelwerte beider Geschlechter bei derselben Konzentration verglichen werden.

Referenzdokumente

Es sind viele Werke zur Statistik erhältlich, in denen die Theorie, der Aufbau, die Methodik, die Analyse und die Interpretation faktorieller Versuchspläne erörtert werden, von einfachen Zweifaktorenanalysen bis hin zu komplexeren Formen, wie sie in der „Design of Experiment“-Methode verwendet werden. Die folgende Auflistung ist nicht erschöpfend. Einige Bücher enthalten Beispiele für die Anwendung vergleichbarer Versuchspläne, in einigen Fällen auch mit einem Code zur Durchführung der Analysen unter Verwendung verschiedener Softwarepakete.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
- (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
- (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

- (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

Anlage 3

GEGENWÄRTIGE EINSATZGRENZEN DES TESTS

Nach aktuellem Kenntnisstand sind mit dem In-vivo-Comet-Assay verschiedene Einsatzgrenzen verbunden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Einsatzgrenzen in dem Maße verringert oder enger definiert werden, wie zunehmende Erfahrungen mit der Anwendung des Tests zur Klärung von Sicherheitsfragen in einem regulatorischen Umfeld beitragen.

1. Einige Arten von DNA-Schädigungen können kurzlebig sein, d. h. zu rasch repariert werden, um 24 Stunden oder noch später nach der letzten Dosis beobachtet werden zu können. Es liegt weder eine Liste der Arten von kurzlebigen Schädigungen noch der Chemikalien vor, die diese Art von Schädigung wahrscheinlich auslösen, und es ist zudem nicht bekannt, über welchen Zeitraum diese Art von Schädigung nachweisbar ist. Die optimalen Probenahmezeitpunkte können außerdem spezifisch für die jeweilige Chemikalie oder den Verabreichungsweg sein und sollten auf kinetischen Daten (z. B. Zeitpunkt T_{\max} , zu dem die höchste Plasma- oder Gewebekonzentration erreicht wird) basieren, falls solche Daten vorliegen. In den meisten Validierungsstudien, auf die sich diese Prüfmethode stützt, wurde eine Sektion 2 oder 3 Stunden nach Verabreichung der letzten Dosis angegeben. In der veröffentlichten Literatur wird beschrieben, dass bei den meisten Studien die letzte Dosis 2 bis 6 Stunden vor der Tötung verabreicht wurde. Daher wurden diese Versuche als Grundlage für die Empfehlung in der Prüfmethode verwendet, wonach in Ermangelung von Daten, die eine andere Vorgehensweise nahelegen, die letzte Dosis zu einem festgelegten Zeitpunkt zwischen 2 und 6 Stunden vor der Sektion verabreicht werden sollte.
2. Es gibt keine validierten Daten zur Empfindlichkeit des Versuchs in Bezug auf den Nachweis kurzlebiger DNA-Schädigungen nach Verabreichung im Futter oder Trinkwasser im Vergleich zur Verabreichung über eine Magensonde. DNA-Schädigungen nach Verabreichung im Futter oder Trinkwasser wurden zwar nachgewiesen, aber es gibt nur wenige solcher Berichte verglichen mit der weitaus größeren Erfahrung mit Magensonden und intraperitonealer Verabreichung. Somit kann die Empfindlichkeit des Tests bei Chemikalien, die bei Verabreichung im Futter oder Trinkwasser kurzlebige Schädigungen auslösen, reduziert sein.
3. Da keine Interlaborstudien an anderen Geweben als Leber und Magen durchgeführt wurden, gibt es keine Empfehlung dazu, wie eine empfindliche und reproduzierbare Reaktion in anderen Geweben als Leber, wie z. B. zu erwartende Bereiche bei Positiv- und Negativkontrollen, zu erreichen ist. Für die Leber konnte ferner keine Einigung über die Festlegung einer niedrigeren Grenze für den Negativkontrollwert erzielt werden.

4. Obwohl in verschiedenen Veröffentlichungen die unklare zytotoxische Wirkung *in vitro* aufgezeigt wurde, wurden nur sehr wenige *In-vivo*-Daten veröffentlicht, sodass keine einzelne Messgröße für die Zytotoxizität empfohlen werden konnte. Histopathologische Veränderungen wie Entzündung, Zellinfiltration, apoptotische oder nekrotische Veränderungen wurden mit einer Zunahme der DNA-Wanderung in Verbindung gebracht. Wie die JaCVAM-Validierungsstudie (OECD, 2014) gezeigt hat, führen diese Veränderungen nicht immer zu positiven Comet-Ergebnissen, sodass keine endgültige Liste der stets mit einer Zunahme der DNA-Wanderung einhergehenden, histopathologischen Veränderungen vorliegt. Es wurde vorgeschlagen, *Hedgehogs* (oder *Clouds*, Geisterzellen) als Indikator für Zytotoxizität zu verwenden, doch die Genese der *Hedgehogs* ist unklar. Es liegen Daten vor, die darauf hindeuten, dass sie durch Zytotoxizität der Chemikalien, mechanisch/enzyminduzierte Schäden, die während der Aufbereitung der Proben hervorgerufen werden (Guerard *et al.*, 2014), und/oder eine extremere Wirkung der Genotoxizität der Prüfchemikalie verursacht werden können. Andere Daten scheinen darauf hinzudeuten, dass sie auf umfangreiche, aber vielleicht reparierbare DNA-Schädigungen zurückzuführen sind (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. Gewebe oder Zellkerne wurden erfolgreich für eine spätere Analyse eingefroren. Dies führt gewöhnlich zu einem messbaren Effekt bei der Reaktion auf die Vehikel- und Positivkontrolle (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Wenn das Labor dieses Verfahren anwendet, sollte es seine Kompetenz bei Einfrieremethoden nachweisen und belegen, dass die Bereiche der prozentualen DNA-Anteile im Schweif in den Zielgeweben bei den mit dem Vehikel behandelten Tieren ausreichend niedrig sind und positive Reaktionen noch nachweisbar sind. In der Literatur wurden verschiedene Methoden für das Einfrieren von Gewebe beschrieben. Allerdings besteht kein Einvernehmen darüber, wie Gewebe am besten einzufrieren und aufzutauen sind und wie zu bewerten ist, ob eine potenziell geänderte Wirkung die Empfindlichkeit des Tests beeinträchtigen kann.
6. Neuere Arbeiten zeigen, dass davon auszugehen ist, dass die Liste der kritischen Variablen weiter verkürzt wird und die Parameter für kritische Variablen näher definiert werden (Guerard *et al.*, 2014).

Referenzdokumente

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.“

(16) In Teil C wird Kapitel C.13 durch Folgendes ersetzt:

„C.13 Bioakkumulationsprüfung am Fisch mit aquatischer Exposition und Exposition über das Futter

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 305 (2012). Mit ihrer Überarbeitung werden im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt. Erstens soll ein Test auf Bioakkumulation infolge der Aufnahme über das Futter¹⁾ einbezogen werden, der für die Bestimmung des Bioakkumulationspotenzials von Stoffen mit sehr niedriger Wasserlöslichkeit geeignet ist. Zweitens soll eine Prüfmethode bereitgestellt werden, bei der aus Tierschutzgründen gegebenenfalls weniger Fische verwendet werden und die somit kostengünstiger ist.
2. In den Jahren seit der Verabschiedung der konsolidierten Prüfmethode C. 13 (1) wurden zahlreiche Stoffe geprüft und von Laboratorien und Regulierungsbehörden umfangreiche Erfahrungen gesammelt. Dies hat zu der Überzeugung geführt, dass die Komplexität des Versuchs verringert werden kann, wenn bestimmte Kriterien erfüllt sind (siehe Nummer 88), und dass ein gestufter Ansatz möglich ist. Die Erfahrung hat gezeigt, dass biologische Faktoren wie Wachstum und Lipidgehalt von Fischen die Ergebnisse erheblich beeinflussen können und berücksichtigt werden sollten. Darüber hinaus wurde erkannt, dass die Prüfung von Stoffen mit sehr geringer Wasserlöslichkeit technisch nicht durchführbar ist. Zudem kann bei Stoffen mit sehr geringer Wasserlöslichkeit im aquatischen Milieu die aquatische Exposition im Vergleich zur Exposition über das Futter geringfügiger sein. Dies hat zur Entwicklung einer Prüfmethode geführt, bei der die Fische über das Futter exponiert werden (siehe Nummern 7-14 und Nummer 97 ff.). Die Prüfung mit Exposition über das Futter wurde 2010 validiert (Ringtest) (51).

Die wichtigsten Änderungen beinhalten Folgendes:

- Die Prüfung nur einer Prüfkonzentration gilt als ausreichend, wenn davon ausgegangen werden kann, dass der Biokonzentrationsfaktor (*bioconcentration factor*, BCF) von der Prüfkonzentration unabhängig ist.
- Es kann ein Versuch mit minimaler aquatischer Exposition und weniger Probenahmezeitpunkten ins Auge gefasst werden, sofern bestimmte Kriterien erfüllt

¹⁾ Für Definitionen und Einheiten siehe Anlage 1.

sind.

- Der Lipidgehalt der Fische sollte gemessen werden, damit der BCF auf Basis eines Lipidgehalts von 5 % ausgedrückt werden kann.
- Neben der Schätzung des BCF im stationären Zustand (*steady state*) wird der Schwerpunkt verstärkt auf die Schätzung des kinetischen BCF (soweit möglich) gelegt.
- Für bestimmte Stoffgruppen wird die Prüfung mit Exposition über das Futter vorgeschlagen, wenn diese Art der Prüfung im Vergleich zur Prüfung mit aquatischer Exposition als geeigneter gilt.
- Das Fischgewicht sollte bestimmt werden, damit der BCF_k um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum korrigiert werden kann.

3. Vor der Durchführung eines Bioakkumulationstests sollte Folgendes über die Prüfchemikalie bekannt sein:

- (a) Empfindlichkeit der Analysetechnik zwecks Messung der Gewebe- sowie der Wasser- und Futterkonzentrationen sowohl für den Prüfstoff als auch für mögliche Metaboliten (siehe Nummer 65).
- (b) Löslichkeit in Wasser [PM A.6; (2)]; diese sollte nach einer Methode bestimmt werden, die für den (geschätzten) Löslichkeitsbereich geeignet ist, um einen zuverlässigen Wert zu erhalten. Bei hydrophoben Stoffen ist dies im Allgemeinen die Säulen-Elutions-Methode.
- (c) n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, $K_{OW}^{(1)}$ [PM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; oder andere geeignete Informationen über das Verteilungsverhalten (z. B. Sorption an Lipiden, K_{OC}); dieses sollte nach einer Methode bestimmt werden, die für den Bereich von K_{OW} (Schätzwert) geeignet ist, um einen zuverlässigen Wert zu erhalten. Bei hydrophoben Stoffen ist dies im Allgemeinen die Prüfung unter langsamem Rühren [TM A.23 (6)];
- (d) Stabilität des Stoffs in Wasser (Hydrolyse [TM C.7 (7)]);

⁽¹⁾ Manchmal als P_{OW} bezeichnet; wird nach einer Schüttelmethode gemäß PM A.8 (4), einer HPLC-Methode gemäß PM A.24 (5) und einer Methode mit langsamem Rühren gemäß PM A.23 (6) bestimmt. Gelegentlich findet die Generatorsäulenmethode (*Generator-Column-Methode*) zur Bestimmung von $\log K_{OW}$ Anwendung. Es gibt eine begrenzte Anzahl von Studien, bei denen diese Methode angewandt wird, überwiegend für chlorierte Biphenyle und Dibenzodioxine (z. B. Li und Doucette, 1993) (3). Bei Stoffen, die ionisieren könnten, sollte sich $\log K_{OW}$ auf die nicht ionisierte Form beziehen.

- (e) Stabilität des Stoffs im Futter (insbesondere wenn ein Prüfungsansatz mit Exposition über das Futter gewählt wird);
- (f) Informationen über die Phototransformation, die für die Bestrahlungsbedingungen der Prüfung relevant sind (8);
- (g) Oberflächenspannung (z. B. bei Stoffen, bei denen $\log K_{OW}$ nicht bestimmt werden kann) [TM A.5 (9)];
- (h) Dampfdruck [TM A.4 (10)];
- (i) Etwaige Informationen über den biotischen oder abiotischen Abbau in Wasser, z. B. über leichte biologische Abbaubarkeit [PM C.4 Teile II bis VII (11), PM C.29 (12)], soweit zutreffend;
- (j) Informationen über Metaboliten: Struktur, $\log K_{OW}$, Bildung und Abbaubarkeit, falls zutreffend;
- (k) Säuredissoziationskonstante (pK_a) für Stoffe, die ionisieren könnten. Der pH-Wert des Prüfwassers sollte angepasst werden, um sicherzustellen, dass der Stoff in ionisierter Form verwendet wird, sofern dies mit der verwendeten Fischart vereinbar ist.

4. Diese Prüfmethode beschreibt ein Verfahren zur Charakterisierung des Potenzials verschiedener Stoffe zur Bioakkumulation in Fischen, unabhängig von der gewählten Expositionsmethode oder dem gewählten Probenahmeschema. Obwohl Durchflusstests empfohlen werden, sind – sofern die Validitätskriterien erfüllt sind (siehe Nummern 24 und 113) – auch semistatische Methoden zulässig. Für die Exposition über das Futter ist zwar kein Durchflusssystem notwendig, um wässrige Konzentrationen des Prüfstoffs aufrechtzuerhalten, es trägt jedoch dazu bei, angemessene Konzentrationen gelösten Sauerstoffs aufrechtzuerhalten, das Wasser sauber zu halten und Einflussfaktoren wie Ausscheidungsprodukte zu beseitigen.

5. Ungeachtet der gewählten Methode enthält diese Prüfmethode genügend Einzelheiten für die Durchführung des Tests, räumt jedoch gleichzeitig genügend Spielraum für die Anpassung des Versuchsplans an die jeweiligen Laborgegebenheiten ein, auch für den Fall, dass die Prüfstoffe unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Die Prüfung bei aquatischer Exposition eignet sich am besten für stabile organische Stoffen mit $\log K_{OW}$ -Werten zwischen 1,5 und 6,0 (13), kann aber auch bei stark hydrophoben Stoffen (mit $\log K_{OW} > 6,0$) angewendet werden, wenn eine stabile und vollständig gelöste Konzentration

des Prüfstoffs in Wasser nachgewiesen werden kann. Kann keine stabile Konzentration des Prüfstoffs in Wasser nachgewiesen werden, wäre ein Versuch mit aquatischer Exposition ungeeignet und die Exposition müsste über das Fischfutter erfolgen (wenngleich Interpretation und Verwendung der Ergebnisse des futterbasierten Tests auch vom Rechtsrahmen abhängen können). Vorläufige Schätzwerte für den Biokonzentrationsfaktor (BCF, manchmal auch als K_B bezeichnet) für organische Stoffe mit $\log K_{OW}$ -Werten von bis zu 9,0 können nach der Gleichung von Bintein *et al.* (14) bestimmt werden. Die vorläufigen Schätzwerte für den Biokonzentrationsfaktor für derart stark hydrophoben Stoffe können höher sein als in Laborversuchen erwartete *Steady-state*-Biokonzentrationsfaktor (BCF_{SS}), insbesondere, wenn für die vorläufige Schätzung ein einfaches lineares Modell angewendet wird. Zu den Parametern, die das Bioakkumulationspotenzial charakterisieren, gehören die Aufnahmekonstante (k_1), die Ausscheidungskonstante (k_2), der *Steady-state*-Biokonzentrationsfaktor (BCF_{SS}), der kinetische Biokonzentrationsfaktor (BCF_K) und der futterbezogene Biomagnifikationsfaktor (BMF)⁽¹⁾.

6. Radioaktiv markierte Prüfstoffe können die Analyse von Wasser-, Futter- und Fischproben erleichtern und für die Entscheidung, ob die Metaboliten identifiziert und quantifiziert werden sollten, herangezogen werden. Wenn nur der Gesamtgehalt an radioaktiven Rückständen gemessen wird (z. B. durch Verbrennung oder Solubilisierung von Gewebe), wird der BCF oder der BMF anhand des Gesamtwerts des Ausgangsstoffes, etwa verbliebener Stoffwechselprodukte und auch des assimilierten Kohlenstoffs bestimmt. BCF- oder BMF-Werte, die auf Basis des Gesamtgehalts an radioaktiven Rückständen ermittelt werden, sind daher nicht direkt mit einem BCF oder BMF vergleichbar, der nur aus der spezifischen chemischen Analyse des Ausgangsstoffes abgeleitet wurde. Trennungsvorgänge wie TLC, HPLC oder GC⁽²⁾ können vor der Analyse in Studien mit radioaktiver Markierung angewendet werden, um den BCF oder BMF anhand des Ausgangsstoffes zu bestimmen. Bei Anwendung von Trennungsvorgängen sollten der Ausgangsstoff und die relevanten Stoffwechselprodukte identifiziert und quantifiziert werden⁽³⁾ (siehe Nummer 65), wenn der BCF oder BMF anhand der Konzentration des Ausgangsstoffes in den Fischen und nicht Gesamtgehalts an radioaktiv markierten Rückständen berechnet werden soll. Auch ist es aufgrund der Analyse und Identifizierung der Rückstände in den Geweben möglich, Untersuchungen des Fischstoffwechsels oder *In-*

⁽¹⁾ Für Definitionen und Einheiten siehe Anlage 1.

⁽²⁾ TLC: *Thin Layer Chromatography* (Dünnschichtchromatographie); HPLC: *High Pressure Liquid Chromatography* (Hochdruckflüssigkeitschromatografie); GC: *Gas Chromatography* (Gaschromatografie)

⁽³⁾ Bestimmte Rahmenvorschriften geben die Analyse von Metaboliten möglicherweise vor, wenn bestimmte Bedingungen vorliegen (siehe Nummer 65).

vivo-Verteilungsstudien mit einer Bioakkumulationsstudie zu kombinieren. Die Möglichkeit einer Metabolismus-Studie lässt sich mithilfe geeigneter Instrumente (z. B. der OECD QSAR Toolbox (15) und QSAR-spezifischer Programme) vorherbestimmen.

7. Die Entscheidung, ob und mit welchem Versuchsaufbau eine Prüfung mit aquatischer Exposition oder mit Exposition über das Futter durchgeführt werden soll, sollte unter Berücksichtigung der Faktoren gemäß Nummer Punkt 3 und der geltenden Rechtsvorschriften getroffen werden. Für Stoffe beispielsweise, die einen hohen $\log K_{OW}$ aufweisen, bei denen aufgrund der Empfindlichkeit verfügbarer Analyseverfahren aber dennoch eine gute Wasserlöslichkeit nachweisbar ist, sollte in erster Linie eine Prüfung mit aquatischer Exposition in Erwägung gezogen werden. Es kann allerdings sein, dass die Informationen über die Wasserlöslichkeit für diese hydrophoben Arten von Stoffen nicht endgültig sind, weshalb vor der Entscheidung über die anzuwendende Methode untersucht werden sollte, ob stabile und messbare wasserlösliche Konzentrationen (stabile Emulsionen sind nicht zulässig), die für eine Prüfung mit aquatischer Exposition geeignet sind, hergestellt werden können (16). Auf der Grundlage der Ausschlusskriterien „Wasserlöslichkeit“ und „Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient“ lässt sich keine genaue Anweisung für die anzuwendende Methode geben, da andere Faktoren (wie Analyseverfahren, Abbau, Adsorption usw.) aus den oben genannten Gründen einen erheblichen Einfluss auf die Anwendbarkeit der Methode haben können. Bei Stoffen mit einem $\log K_{OW}$ -Wert von über 5 und einer Wasserlöslichkeit von unter $\sim 0,01-0,1$ mg/l wird die Prüfung mit aquatischer Exposition jedoch möglicherweise immer schwieriger.
8. Auch andere Faktoren, die die Wahl der Prüfmethode beeinflussen können, sollten geprüft werden, wie das Potenzial des Stoffes zur Anlagerung an Prüfgefäße und Apparaturen, seine Stabilität in wässriger Lösung im Vergleich zur Stabilität im Futter (17) (18) usw.
9. Informationen über diese praktischen Aspekte lassen sich möglicherweise auch aus anderen abgeschlossenen Studien im Wassermilieu herleiten. Weitere Informationen über die Prüfung von Aspekten im Zusammenhang mit der Durchführung von Bioakkumulationsstudien sind in der Fachliteratur verfügbar (z. B. (19)).
10. Bei Stoffen, bei denen die Löslichkeit oder die Aufrechterhaltung der wässrigen Konzentration sowie die Analyse dieser Konzentrationen keine Einschränkungen für die Durchführung der Methode mit aquatischer Exposition darstellen, ist diese Methode für die Bestimmung des Biokonzentrationspotenzials des Stoffes zu bevorzugen. Es sollte in jedem Fall sichergestellt werden, dass die zu verwendende(n) Expositionskonzentration(en) den Kriterien für die Wasserlöslichkeit in den Prüfmedien genügt (genügen). Für die Aufrechterhaltung stabiler Konzentrationen des gelösten Prüfstoffes sind verschiedene Methoden denkbar, z. B. die Verwendung von Stammlösungen oder passive Dosierung (z. B. nach der Säulen-Elutions-Methode), sofern nachgewiesen werden kann, dass stabile Konzentrationen aufrechterhalten werden können und die Prüfmedien nicht von den Empfehlungen unter Nummer 27 abweichen.

11. Bei stark hydrophoben Stoffen ($\log K_{OW} > 5$ und Löslichkeit unter $\sim 0,01-0,1$ mg/l) kann sich die Prüfung mit aquatischer Exposition als zunehmend schwierig erweisen. Gründe hierfür können sein, dass die wässrige Konzentration nicht auf einem Wert gehalten werden kann, der als hinreichend konstant erachtet wird (z. B. aufgrund der Sorption am Glas der Prüfgefäße oder rascher Aufnahme durch die Fische), oder dass die zu verwendenden wässrigen Konzentrationen so gering sind, dass sie innerhalb der Größenordnung der analytischen Quantifizierungsgrenze oder darunter liegen⁽¹⁾. Für diese stark hydrophoben Stoffe wird die Prüfung mit Exposition über das Futter empfohlen, vorausgesetzt, sie entspricht den einschlägigen Rahmenvorschriften und dem Erfordernis der Risikobewertung.
12. Bei Tensiden sollte geprüft werden, ob - angesichts der Eigenschaften des Stoffes - der Biokonzentrationsstest im aquatischen Milieu durchführbar ist; ansonsten wäre die Prüfung mit Exposition über das Futter geeigneter. Tenside sind oberflächenaktive Stoffe, die die Grenzflächenspannung zwischen zwei Flüssigkeiten verringern. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters (d. h. sie enthalten sowohl einen hydrophilen als auch einen hydrophoben Teil) akkumulieren sie an Grenzflächen wie der Wasser/Luft-Grenzfläche, der Wasser/Futter-Grenzfläche und Glaswänden, was die Bestimmung ihrer Konzentration im Wassermilieu behindert.
13. Bei der Prüfung mit Exposition über das Futter können einige der bei komplexen Gemischen mit Komponenten unterschiedlicher Wasserlöslichkeitsgrenzen auftretenden Expositionsprobleme insoweit umgangen werden, als eine vergleichbare Exposition aller Komponenten des Gemischs über das Futter wahrscheinlicher ist als über das Wasser (siehe (20)).
14. Es ist zu beachten, dass die Methode mit Exposition über das Futter einen futterbezogenen Biomagnifikationsfaktor (BMF) und nicht etwa einen Biokonzentrationsfaktor (BCF)⁽²⁾ ergibt. Es existieren Ansätze zur Schätzung eines kinetischen Biokonzentrationsfaktors (BCF_K) anhand von Daten aus dem Versuch mit Exposition über das Futter (siehe Anlage 8), jedoch sollten diese mit Vorsicht angewendet werden, denn sie setzen im Allgemeinen eine Kinetik erster Ordnung voraus und sind nur auf bestimmte Gruppen von Verbindungen anwendbar. Auf Tenside lassen sie sich wahrscheinlich nicht anwenden (siehe Nummer 12).

⁽¹⁾ Im Allgemeinen sollten die während der Aufnahmephase in Wasser gemessenen Konzentrationen mindestens eine Zehnerpotenz über der Quantifizierungsgrenze liegen, sodass in der Ausscheidungsphase der Studie mehr als eine Halbwertszeit der Körperbelastung gemessen werden kann.

⁽²⁾ Für Definitionen und Einheiten siehe Anlage 1.

15. Ein Versuch mit minimaler aquatischer Exposition und weniger Probenahmezeitpunkten, der es gestattet, die Zahl der erforderlichen Versuchstiere und/oder Ressourcen (siehe Nummer 83 ff.) zu begrenzen, sollte nur bei Stoffen angewendet werden, bei denen mit gutem Grund davon ausgegangen werden kann, dass Aufnahme und Ausscheidung ungefähr nach dem Schema der Kinetik erster Ordnung ablaufen (also eher bei nicht ionisierten organischen Stoffen, siehe Nummer 88).

C.13 - I: Biokonzentrationsprüfung am Fisch mit aquatischer Exposition

TESTPRINZIP

16. Der Test besteht aus zwei Phasen: der Expositionsphase (oder Aufnahmephase) und der Post-Expositionsphase (oder Ausscheidungsphase). Während der Aufnahmephase wird eine Gruppe von Fischen ein und derselben Spezies je nach Eigenschaften des Prüfstoffes einer oder mehreren ausgewählten Prüfstoffkonzentrationen ausgesetzt (siehe Nummer 49). Sie werden anschließend für die Ausscheidungsphase in ein Medium ohne Prüfstoff eingesetzt. Eine Ausscheidungsphase ist immer erforderlich, es sei denn, die Aufnahme des Stoffes während der Aufnahmephase war unbedeutend. Die Konzentration des Prüfstoffes in/auf den Fischen (oder bestimmten Gewebeteilen von Fischen) wird in beiden Testphasen beobachtet. Zusätzlich zu der behandelten Gruppe wird eine Kontrollgruppe von Fischen unter – abgesehen vom fehlenden Prüfstoff – gleichen Bedingungen gehalten, um eventuelle schädigende Wirkungen, die während der Biokonzentrationsprüfung beobachtet werden, mit einer Kontrollgruppe vergleichen zu können und um Hintergrundkonzentrationen des Prüfstoffes zu erfahren¹.
17. Bei der Prüfung mit aquatischer Exposition dauert die Aufnahmephase in der Regel 28 Tage. Sie kann ggf. verlängert (siehe Nummer 18) oder verkürzt werden, wenn nachgewiesen wird, dass schon zu einem früheren Zeitpunkt ein stationärer Zustand (*steady state*) erreicht wird (für Definitionen und Einheiten siehe Anlage 1). Die Dauer der Aufnahmephase und die Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustands kann anhand der Gleichungen in Anlage 5 vorausgeschätzt werden. Die Ausscheidungsphase beginnt, wenn die Fische dem Prüfstoff nicht länger ausgesetzt sind, d. h. mit der Umsetzung der Tiere in ein sauberes Gefäß, das ein bis auf den Prüfstoff identisches Medium enthält. Wenn möglich, sollte der Biokonzentrationsfaktor sowohl als Quotient der Konzentration in den

¹Für die meisten Prüfstoffe gilt, dass sie im Kontrollwasser möglichst nicht nachweisbar sein sollten. Hintergrundkonzentrationen sollten nur für natürlich vorkommende Stoffen (z. B. bestimmte Metalle) und bei in der Umwelt allgemein vorkommende Stoffe relevant sein.

Fischen (C_f) und im Wasser (C_w) bei stationärem Zustand (BCF_{SS} ; für die Definition siehe Anlage 1) berechnet werden, als auch als kinetischer Biokonzentrationsfaktor BCF_K ; für Definitionen und Einheiten siehe Anlage 1), der geschätzt wird als Quotient der Aufnahme- (k_1) und der Ausscheidungskonstante (k_2), wobei eine Kinetik erster Ordnung vorausgesetzt wird⁽¹⁾.

18. Wird innerhalb von 28 Tagen kein stationärer Zustand (*steady state*) erreicht, wird der BCF entweder nach dem kinetischen Ansatz (*siehe* Nummer 38) berechnet oder die Aufnahmephase kann verlängert werden. Dauert die Aufnahmephase bis zum Erreichen des stationären Zustands unangemessen lange (*siehe* Nummern Punkte 37 und 38, Anlage 5), ist der kinetische Ansatz zu bevorzugen. Alternativ sollte bei stark hydrophoben Stoffen eine Studie mit Exposition über das Futter in Betracht gezogen werden⁽²⁾, vorausgesetzt, eine solche Studie läuft den einschlägigen Rahmenvorschriften nicht zuwider.
19. Die Aufnahmekonstante, die Ausscheidungskonstante (oder -konstanten, soweit komplexere Modelle verwendet werden), der Biokonzentrationsfaktor (*steady-state* und/oder kinetisch) und, wenn möglich, die Konfidenzgrenzen jedes einzelnen dieser Parameter werden nach dem Modell berechnet, das die gemessenen Konzentrationen des Prüfstoﬀs in den Fischen und im Wasser am besten beschreibt (*siehe* Anlage 5).
20. Die Zunahme der Fischmasse während der Prüfung führt zu einer Verringerung der Prüfstoﬀkonzentration in den wachsenden Fischen (sogenannte Verdünnung durch Wachstum), weshalb der kinetische BCF zu niedrig geschätzt wird, wenn er nicht um das Wachstum korrigiert wird (*siehe* Nummern 72 und 73).
21. Der BCF basiert auf der Gesamtkonzentration in den Fischen (d. h. auf dem Gesamtnassgewicht der Fische). Für besondere Zwecke können jedoch auch bestimmte Gewebe oder Organe (z. B. Muskeln, Leber) verwendet werden, sofern die Fische groß genug sind, oder die Fische können in essbare (Filets) und nicht-essbare (Viszera) Fraktionen unterteilt werden. Da bei vielen organischen Stoffen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Biokonzentrationspotenzial und Hydrophobie besteht, gibt es entsprechend auch einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Lipidgehalt der Versuchsfische und der beobachteten Biokonzentration derartiger Stoffe. Um derart variable Testergebnisse bei stark lipophilen Stoffen (d. h. Stoffen mit $\log K_{OW} > 3$) zu begrenzen, sollte die

⁽¹⁾ Folgen die Messdaten offensichtlich nicht der Kinetik erster Ordnung, sollten komplexere Modelle verwendet (*siehe* Referenzdokumente in *Anlage 5*) und der Rat eines Biostatistikers eingeholt werden.

⁽²⁾ Die Aufnahme kann bei der Biokonzentrationsprüfung aufgrund niedriger Expositionskonzentrationen wegen geringer Wasserlöslichkeit begrenzt sein, wohingegen bei der Prüfung mit Exposition über das Futter weitaus höhere Expositionskonzentrationen erreicht werden können.

Biokonzentration zusätzlich zu dem aus der Studie direkt abgeleiteten Wert auf einen Fischlipidgehalt von 5 % (basierend auf dem Ganzkörpernassgewicht) standardisiert werden. Dies ist notwendig, um eine Grundlage für den Vergleich zwischen verschiedenen Stoffen und/oder Versuchsspezies zu ermöglichen. Ein Lipidgehalt von 5 % ist ein gängiger Wert, denn er entspricht dem durchschnittlichen Lipidgehalt von Fischen, die bei dieser Prüfmethode normalerweise verwendet werden (21).

ANGABEN ZUM PRÜFSTOFF

22. Zusätzlich zu den in der Einleitung genannten Prüfstoffeigenschaften (Nummer 3) müssen auch Informationen über die toxische Wirkung auf die Versuchsspezies vorliegen – vorzugsweise der asymptotische (*d. h.* zeitunabhängige) LC_{50} -Wert – und/oder Schätzwerte zur Toxizität aus Langzeitversuchen an Fischen (z. B. TM C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).
23. Eine geeignete Analysemethode von bekannter Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit sowie Einzelheiten der Probenvorbereitung und -aufbewahrung sollten für die Quantifizierung des Prüfstoffs in den Testlösungen und im biologischen Material verfügbar sein. Ebenso sollten die analytischen Nachweisgrenzen des Prüfstoffs in Wasser sowie in den Fischgeweben bekannt sein. Wird ein radioaktiv markierter Prüfstoff verwendet, sollte dieser von höchstmöglicher Reinheit (von möglichst > 98 %) sein; auch der Prozentanteil der auf Verunreinigungen zurückzuführenden Radioaktivität sollte bekannt sein.

GÜLTIGKEIT DES TESTS

24. Ein Test wird als gültig betrachtet, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

Die Temperaturschwankung beträgt weniger als ± 2 °C, denn große Schwankungen können sich auf die biologischen Parameter, die für die Aufnahme und Ausscheidung relevant sind, auswirken und bei den Tieren Stress auslösen;

der Sättigungswert der Konzentration an gelöstem Sauerstoff fällt nicht unter 60 %;

die Konzentration des Prüfstoffs in den Kammern wird auf dem während der Aufnahmephase gemessenen Durchschnittswert ± 20 % gehalten;

die Konzentration des Prüfstoffs liegt unter der Grenze seiner Löslichkeit in Wasser, wobei die potenzielle Wirkung des Prüfwassers auf die tatsächliche Löslichkeit zu berücksichtigen ist⁽¹⁾;

Mortalität oder andere Schädwirkungen/Krankheiten bei Kontroll- und Versuchsfischen betragen bei Prüfungsende weniger als 10 %; erstreckt sich die Prüfung über mehrere Wochen oder Monate, sollten Mortalität oder andere Schädwirkungen bei beiden Fischgruppen weniger als 5 % pro Monat betragen und insgesamt 30 % nicht überschreiten. Signifikante Unterschiede im durchschnittlichen Wachstum zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen könnten auf eine toxische Wirkung des Prüfstoffs hinweisen.

REFERENZSTOFFE

25. Die Verwendung von Referenzstoffen mit bekanntem Biokonzentrationspotential und schwachem Metabolismus wäre zur Kontrolle des Versuchsablaufs möglicherweise sinnvoll (z. B. wenn ein Labor keine vorherige Prüfungserfahrung hat oder die Versuchsbedingungen geändert wurden).

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

26. Für alle Teile der Apparatur sollten Materialien, die sich auflösen, sorbieren oder auslaugen und die Fische schädigen können, möglichst vermieden werden. Verwendet werden können rechteckige oder zylindrische Behälter aus chemisch inertem Material und mit besatzgerechtem Fassungsvermögen (siehe Nummer 43). Die Verwendung von Rohren aus Weichkunststoff sollte auf ein Minimum beschränkt werden. Rohre aus Polytetrafluorethylen, Edelstahl und/oder Glas sind zu bevorzugen. Die Erfahrung hat gezeigt, dass bei Prüfstoffen mit hohem Adsorptionskoeffizient, wie synthetischen Pyrethroiden, die Verwendung von silanisiertem Glas nötig sein kann. In solchen Fällen sollte die Apparatur nach der Benutzung entsorgt werden. Die Versuchssysteme sollten den in der Studie zu verwendenden Prüfstoffkonzentrationen möglichst so lange ausgesetzt werden, bis die Expositionskonzentrationen nachweislich stabil sind; erst dann sollten die Prüforganismen eingesetzt werden.

⁽¹⁾ Bei mehrkomponentigen Stoffen, UVCB-Stoffen und Gemischen sollte zur Bestimmung der geeigneten Expositionskonzentrationen die Wasserlöslichkeit jeder relevanten Komponente berücksichtigt werden.

Wasser

27. Allgemein wird für den Test natürliches Wasser verwendet, das aus einer unverschmutzten Quelle gleichbleibend guter Qualität stammt. Rekonstituiertes Wasser (d. h. entmineralisiertes Wasser, dem spezifische Nährstoffe in bekannten Mengen zugegeben wurden) ist jedoch möglicherweise besser geeignet, um im Zeitverlauf gleichbleibend gute Qualität zu gewährleisten. Das Verdünnungswasser (d. h. das Wasser, das vor dem Einfüllen in das Prüfgefäß mit dem Prüfstoff gemischt wird; *siehe* Nummer 30) muss von einer Qualität sein, die ein Überleben der gewählten Versuchsspezies für die Dauer der Akklimatisations- und Prüfperiode ermöglicht, ohne dass diese ein abnormes Erscheinungsbild oder Verhalten zeigen. Im Idealfall sollte nachgewiesen werden, dass die Prüfspezies im Verdünnungswasser (z. B. in einer Laborkultur oder in einem Lebenszyklus-Toxizitätstest) überleben, wachsen und sich vermehren. Über das Verdünnungswasser sollten zumindest Angaben über pH-Wert, Härte, Gesamtfeststoffgehalt, gesamten organischen Kohlenstoff (TOC ⁽¹⁾) und möglichst auch für Ammonium, Nitrit und Alkalität bzw. – für die Meerwasserspezies – Salinität vorliegen. Nicht alle Parameter, die für einen optimalen Schutz der Fische wichtig sind, sind bekannt, doch werden in Anlage 2 für eine Reihe von Parametern die empfohlenen Höchstkonzentrationen für Süß- und Meeresprüfwasser genannt.
28. Während der Prüfungsdauer sollte das Verdünnungswasser von gleichbleibender Qualität sein. Der pH-Wert sollte bei Prüfungsbeginn zwischen 6,0 und 8,5 liegen, doch während des Prüfungsablaufs sollte er um nicht mehr als $\pm 0,5$ pH-Einheiten schwanken. Um sicherzugehen, dass das Verdünnungswasser das Prüfungsergebnis nicht übermäßig stark beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung des Prüfstoffs) oder schädigende Wirkungen auf den Fischbestand hat, sollten in gewissen Abständen, zumindest am Anfang und am Ende der Prüfung, Proben zur Analyse entnommen werden. Soweit das Verdünnungswasser bekanntermaßen von relativ konstanter Qualität ist, sollten alle drei Monate der Gehalt an Schwermetallen (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), an Hauptanionen und -kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- und SO_4^{2-}), an Pestiziden (z. B. der Gesamtgehalt an phosphororganischen und chlororganischen Pestiziden), der TOC und die Schwebstoffe bestimmt werden. Hat sich die Wasserqualität über mindestens ein Jahr als konstant erwiesen, können diese Untersuchungen reduziert und in größeren Zeitabständen (z. B. alle sechs Monate) durchgeführt werden.
29. Der natürliche Partikelgehalt und der gesamte organische Kohlenstoff des Verdünnungswassers sollten möglichst niedrig sein, um Adsorption des Prüfstoffs an

⁽¹⁾ TOC umfasst organischen Kohlenstoff aus Partikeln und gelöstem organischen Kohlenstoff, d. h. $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$.

organische Stoffe zu vermeiden, weil deren Bioverfügbarkeit dadurch reduziert und somit der BCF zu niedrig geschätzt werden könnte. Der maximal zulässige Wert beträgt 5 mg/l für Partikel (Trockenstoff, der einen Filter von 0,45 µm nicht passiert) und 2 mg/l für den gesamten organischen Kohlenstoff (siehe Anlage 2). Gegebenenfalls sollte das Wasser vor der Verwendung gefiltert werden. Der Anteil von Fischausscheidungen und Futterresten am organischen Kohlenstoffgehalt des Wassers sollte so gering wie möglich sein (siehe Nummer 46).

Prüflösungen

30. Eine Stammlösung des Prüfstoffs wird in entsprechender Konzentration vorbereitet, vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren des Prüfstoffs in das Verdünnungswasser. Als mögliche Alternative, die sich in bestimmten Fällen anbietet, kann ein Dosierungssystem mit Festphasen-Desorption verwendet werden. Die Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln (Lösungsvermittlern) wird im Allgemeinen nicht empfohlen (siehe (25)), auch wenn dies in bestimmten Fällen nötig sein sollte, um eine entsprechend konzentrierte Stammlösung herzustellen; doch sollte die Verwendung solcher Materialien auf ein Minimum beschränkt und deren kritische Mizellenkonzentration nicht überschritten werden (falls relevant). In Frage kommende Lösungsmittel sind Ethanol, Methanol, Dimethylformamid und Triethylenglykol. Geeignete Dispergiermittel sind Tween 80, Methylzellulose 0,01 % und HCO-40. Die Lösungsmittelkonzentration im endgültigen Prüfmedium sollte bei allen Behandlungen (ungeachtet der Prüfstoffkonzentration) identisch sein und die entsprechenden Toxizitätsschwellenwerte, die für das Lösungsmittel unter den Prüfungsbedingungen festgelegt wurden, sollten nicht überschritten werden. Die Höchstkonzentration beträgt 100 mg/l (oder 0,1 ml/l). Es ist unwahrscheinlich, dass eine Lösungsmittelkonzentration von 100 mg/l die gelöste Höchstkonzentration des Prüfstoffs, die in dem Medium erreicht werden kann, erheblich beeinflussen wird (25). Der Beitrag des Lösungsmittels (zusammen mit dem Prüfstoff) zum Gesamtgehalt des Prüfwasser an organischem Kohlenstoff sollte bekannt sein. Während der gesamten Prüfungsdauer sollte die Konzentration des gesamten organischen Kohlenstoffs in den Prüfgefäßen die Konzentration des organischen Kohlenstoffs aus dem Prüfstoff und, falls verwendet, dem Lösungsmittel oder Lösungsvermittler⁽¹⁾ um nicht mehr als 10 mg/l (± 20 %) überschreiten. Der Gehalt an organischen Stoffen kann bei Durchflussprüfungen an Fischen die Menge an frei gelöstem Prüfstoff erheblich beeinflussen, insbesondere bei

⁽¹⁾ Wird ein Lösungsmittel oder Lösungsvermittler verwendet (obwohl dies in der Regel nicht empfohlen wird), sollte der daraus resultierende organische Kohlenstoff dem organischen Kohlenstoff aus dem Prüfstoff hinzugerechnet werden, damit die Konzentration des organischen Kohlenstoffs in den Prüfgefäßen bewertet werden kann.

lipophilen Stoffen. Festphasen-Mikroextraktion (siehe Nummer 60) kann wichtige Informationen über das Verhältnis zwischen gebundenen und frei gelösten Verbindungen liefern, wobei bei Letzteren davon ausgegangen wird, dass sie dem bioverfügbaren Teil entsprechen. Die Prüfstoffkonzentration sollte trotz Verwendung eines Lösungsmittels oder Lösungsvermittlers unter der Löslichkeitsgrenze des Prüfstoffs im Prüfmedium liegen. Bei Verwendung biologisch leicht abbaubarer Stoffe ist Vorsicht geboten, da diese im Durchflusstest Probleme in Form von Bakterienwachstum verursachen können. Falls eine Stammlösung nicht ohne Lösungsvermittler hergestellt werden kann, sollte die Eignung einer Prüfung mit aquatischer Exposition zugunsten einer Prüfung mit Exposition über das Futter überdacht werden.

31. Für Durchflussprüfungen ist ein System erforderlich, das kontinuierlich eine Stammlösung des Prüfstoffs abgibt und verdünnt (z. B. Dosierpumpe, Proportionalverdünner, Sättigungsvorrichtung), oder ein Dosierungssystem mit Festphasen-Desorption, um die Prüfkonzentrationen den Prüfkammern zuzuführen. Die Inhalte der Prüfkammern sollten täglich mindestens fünf Mal ausgetauscht werden, wobei das Durchflussverfahren zu bevorzugen ist. Ist dies nicht möglich (wenn z. B. schädigende Wirkungen auf die Prüforganismen zu erwarten sind), kann ein semistatisches Verfahren angewendet werden, sofern die Validitätskriterien erfüllt sind (siehe Nummer 24). Die Durchflussgeschwindigkeit der Stammlösungen und des Verdünnungswassers sollten 48 Stunden vor sowie einmal täglich während der Prüfung kontrolliert werden. Dabei sollte auch die Durchflussgeschwindigkeit für jede Prüfkammer bestimmt und sichergestellt werden, dass sie innerhalb oder zwischen den Kammern um nicht mehr als 20 % abweicht.

Auswahl der Spezies

32. Wichtig für die Auswahl der Spezies ist, dass die Tiere leicht und in geeigneter Größe erhältlich sind und problemlos im Labor gehalten werden können. Andere Kriterien zur Auswahl der Fischart sind u. a. ihr Freizeit-, Handels- und ökologischer Wert sowie eine vergleichbare Empfindlichkeit, ein erfolgreicher Einsatz in früheren Prüfungen usw. Die empfohlenen Versuchsspezies sind in Anlage 3 aufgeführt. Es können auch andere Spezies verwendet werden, doch muss das Prüfverfahren dann u. U. angepasst werden, um geeignete Prüfungsbedingungen zu schaffen. Die Gründe für die Auswahl der Spezies und der Versuchsmethode sollten in diesem Fall genau dokumentiert werden. Im Allgemeinen verkürzt sich durch die Verwendung kleinerer Fischarten die Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustands, jedoch werden mehr Fische (Proben) benötigt, um den Lipidgehalt und die Prüfstoffkonzentrationen in den Fischen angemessen zu analysieren. Außerdem können Unterschiede bei Atmungsrate und Metabolismus zwischen jungen und älteren Fischen Ergebnisvergleiche zwischen verschiedenen Prüfungen und Versuchsspezies erschweren. Es ist zu beachten, dass bei Fischarten, die in einer (juvenilen) wachstumsintensiven Lebensphase geprüft werden, die Interpretation der Daten schwierig sein kann.

Haltung der Fische (relevant bei aquatischer Exposition und Exposition über das Futter)

33. Die Stammpopulation der Fische sollte mindestens zwei Wochen lang im Wasser (siehe Nummer 28) bei Prüftemperatur eingewöhnt und ausreichend gefüttert werden (siehe Nummer 45). Es sollten Wasser und Futter derselben Art verwendet werden wie während der Prüfung.
34. Nach 48-stündiger Eingewöhnung werden die Mortalitäten erfasst; dabei wird wie folgt vorgegangen :
 - bei einer Mortalität von mehr als 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen: Austausch des gesamten Besatzes;
 - bei einer Mortalität zwischen 5 und 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen: weitere sieben Tage Akklimatisation – bei einer Mortalität innerhalb der folgenden sieben Tage von über 5 %: Austausch des gesamten Besatzes;
 - bei einer Mortalität unter 5 % der Population innerhalb von sieben Tagen: Akzeptanz des gesamten Besatzes.
35. Die Versuchsfische sollten keine sichtbaren Erkrankungen oder Anormalitäten aufweisen. Alle kranken Fische sind zu entfernen. Die Fische sollten zwei Wochen vor und während der Prüfung nicht gegen Krankheiten behandelt werden.

PRÜFUNGSABLAUF

Vorversuch

36. Es kann sinnvoll sein, einen Vorversuch durchzuführen, um die Bedingungen für den Hauptversuch zu optimieren, z. B. in Bezug auf die Wahl der Prüfstoffkonzentration(en), die Dauer der Aufnahme- und Ausscheidungsphase, oder um zu bestimmen, ob die Prüfung vollständig durchgeführt werden muss. Der Vorversuch sollte so aufgebaut sein, dass die erforderlichen Informationen ermittelt werden können. Es kann geprüft werden, ob ein Versuch unter minimalen Bedingungen für die Ableitung eines BCF ausreicht oder ob ein vollständiger Versuch notwendig ist (siehe Nummern 83-95 zum Versuch unter minimalen Bedingungen).

Expositionsbedingungen

Dauer der Aufnahmephase

37. Die Dauer der Aufnahmephase lässt sich anhand praktischer Erfahrungen (z. B. aus einer früheren Untersuchung oder einer Akkumulationsstudie an einem strukturell verwandten Stoff) oder aus bestimmten empirischen Beziehungen, wobei auf Wissen über die Wasserlöslichkeit oder den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten des Prüfstoffs (vorausgesetzt, die Aufnahme folgt der Kinetik erster Ordnung; *siehe* Anlage 5) zurückgegriffen wird, vorausschätzen.

38. Die Aufnahmephase sollte 28 Tage dauern, sofern ein stationärer Zustand nachweislich nicht bereits zu einem früheren Zeitpunkt erreicht wurde (siehe Anlage 1, Definitionen und Einheiten). Ein „*steady state*“ oder stationärer Zustand gilt in der graphischen Darstellung des gegen die Zeit aufgetragenen Prüfstoffes in Fischen (C_f) als erreicht, wenn die Kurve parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinanderfolgende C_f -Analysen von Proben, die im Abstand von mindestens zwei Tagen entnommen wurden, um nicht mehr als $\pm 20\%$ voneinander abweichen bzw. wenn es in der Zeit zwischen der ersten und der letzten der nacheinander durchgeführten Analysen keinen bedeutenden Anstieg von C_f gibt. Werden gepoolte Proben analysiert, sind mindestens vier aufeinanderfolgende Analysen erforderlich. Für Prüfstoffe, die nur langsam aufgenommen werden, wäre ein zeitlicher Abstand zwischen den Probenahmen von sieben Tagen geeigneter. Stellt sich innerhalb von 28 Tagen kein stationärer Zustand ein, so wird der BCF entweder nach dem kinetischen Ansatz berechnet (bei dem kein stationärer Zustand erreicht werden muss) oder die Aufnahmephase kann um weitere Messungen verlängert werden, bis ein stationärer Zustand erreicht ist, oder um 60 Tage, je nach dem, welcher Termin als erster eintritt. Außerdem muss die Prüfstoffkonzentration in den Fischen am Ende der Aufnahmephase hinreichend hoch sein, um eine zuverlässige Schätzung von k_2 aus der Ausscheidungsphase zu gewährleisten. Wenn sich nach 28 Tagen keine signifikante Aufnahme gezeigt hat, kann der Versuch gestoppt werden.

Dauer der Ausscheidungsphase

39. Bei Stoffen, die der Kinetik erster Ordnung folgen, reicht eine halbe Aufnahmephase in der Regel für eine angemessene Reduzierung (z. B. 95 %) der stoffbedingten Körperbelastung aus (zur Erläuterung dieser Schätzung siehe Anlage 5). Ist die Zeit für eine 95 %ige Ausscheidung jedoch unangemessen lang und wird die normale Dauer der Aufnahmephase beispielsweise um mehr als das Doppelte überschritten (d. h. mehr als 56 Tage), kann die Phase entsprechend verkürzt werden (z. B. bis die Prüfstoffkonzentration weniger als 10 % der Konzentration bei stationärem Zustand beträgt). Bei Stoffen mit komplexeren Aufnahme- und Ausscheidungsmustern, als sie durch ein Einkompartiment-Fischmodell dargestellt werden können (bei einer Kinetik erster Ordnung), sind jedoch unter Umständen längere Ausscheidungsphasen notwendig. Wenn solche komplexen Muster beobachtet und/oder erwartet werden, empfiehlt es sich, den Rat eines Biostatistikers und/oder Pharmakokinetikers einzuholen, um einen vorschriftsmäßigen Versuchsaufbau sicherzustellen. Da die Ausscheidungsphase verlängert wird, kann die Anzahl der erforderlichen Fischproben an Grenzen stoßen und können Wachstumsunterschiede zwischen den Fischen die Ergebnisse beeinflussen. Die Phase richtet sich auch nach dem Zeitraum, über den die Konzentration des Prüfstoffs in den Fischen oberhalb der analytischen Quantifizierungsgrenze bleibt.

Zahl der Versuchsfische

40. Die Zahl der Fische je Prüfkonzentration sollte so gewählt werden, dass bei jeder Probenahme mindestens vier Fische je Probe zur Verfügung stehen. Die Fische sollten nur gepoolt werden, wenn eine Analyse einzelner Fische nicht möglich ist. Wird bei der Kurvenanpassung (und den abgeleiteten Parametern) eine höhere Genauigkeit angestrebt oder sind Metabolismusuntersuchungen erforderlich (z. B. zur Unterscheidung zwischen Metaboliten und Ausgangsstoff bei Verwendung radioaktiv markierter Prüfstoffe) sind mehr Fische je Probe erforderlich. Der Lipidgehalt sollte an demselben biologischen Material bestimmt werden, das auch für die Bestimmung der Konzentration des Prüfstoffs verwendet wird. Sollte dies nicht möglich sein, sind eventuell zusätzliche Fische erforderlich (siehe Nummer 56 und 57).
41. Werden ausgewachsene (d. h. geschlechtsreife) Fische verwendet, sollten sie nicht in der Laichphase sein oder kürzlich erst gelaicht haben (entweder vor noch während des Versuchs). Zudem sollte angegeben werden, ob es sich um männliche oder weibliche Tiere handelt bzw. ob beide Geschlechter für den Versuch eingesetzt werden. Werden beide Geschlechter verwendet, sollten Unterschiede bei Wachstum und Lipidgehalt zwischen den Geschlechtern vor Beginn der Exposition als nicht signifikant dokumentiert werden, insbesondere wenn ein Pooling der männlichen und weiblichen Fische voraussichtlich notwendig sein wird, um nachweisbare Stoffkonzentrationen und/oder Lipidgehalte sicherzustellen.
42. Für jede Prüfung werden Fische von vergleichbarem Gewicht gewählt, sodass die kleinsten nicht weniger als zwei Drittel des Gewichts der größten Tiere aufweisen. Alle sollten derselben Altersgruppe angehören und dieselbe Herkunft haben. Da Gewicht und Alter eines Fisches einen bedeutenden Einfluss auf die BCF-Werte (12) haben können, sollten diese Angaben sorgfältig dokumentiert werden. Das Wiegen einer Teilprobe der Fischpopulation vor Durchführung der Prüfung wird empfohlen, damit das Durchschnittsgewicht geschätzt werden kann (siehe Nummer 61).

Besatz

43. Es werden hohe Wasser/Fisch-Verhältnisse gewählt, damit die durch den Einsatz der Fische zu Beginn des Versuchs verursachte Verringerung der Konzentration der Prüfverbindung im Wasser auf ein Mindestmaß zu begrenzen und auch eine Verringerung der Konzentration des gelösten Sauerstoffs zu vermeiden. Wichtig ist, dass die Besatzrate für die jeweils verwendete Prüfspezies geeignet ist. In der Regel wird eine Besatzrate von 0,1-1,0 g Fisch (Nassgewicht) pro Liter Wasser und Tag empfohlen. Höhere Besatzraten sind möglich, wenn nachgewiesen werden kann, dass die erforderliche Prüfstoffkonzentration mit einer Toleranzmarge von $\pm 20\%$ aufrechterhalten werden kann und die Sättigungskonzentration des gelösten Sauerstoffs nicht unter 60 % sinkt (siehe Nummer 24).

44. Bei der Entscheidung über die geeignete Besatzrate ist dem normalen Lebensraum der Fischart Rechnung zu tragen. So erfordern auf dem Meeresboden lebende Fische im Aquarium bei gleicher Wassermenge möglicherweise eine größere Bodenfläche als pelagische Fischarten.

Fütterung

45. Während der Akklimatisations- und Prüfphase sind die Fische mit geeignetem Futter von bekanntem Lipid- und Gesamtproteingehalt in einer Menge zu füttern, die gewährleistet, dass die Tiere gesund bleiben und ihr Gewicht halten (geringfügiges Wachstum ist zulässig). Die Fische werden während der gesamten Dauer der Akklimatisations- und Prüfphase täglich mit einer der Art, den Versuchsbedingungen und dem Brennwert des Futters (bei Regenbogenforellen beispielsweise ca. 1 bis 2 % Körpergewicht/Tag) angepassten Menge Futter gefüttert. Die Fütterungsrate sollte so gewählt werden, dass schnelles Wachstum und eine starke Zunahme des Lipidgehalts vermieden werden. Die Futtermenge sollte ggf. (zum Beispiel einmal pro Woche) neu berechnet werden, um die Fütterungsrate aufrecht erhalten zu können. Dazu kann das Gewicht der Fische in den einzelnen Prüfkammern anhand des Gewichts der Fische in der Kammer geschätzt werden, die zuletzt beprobt wurde. Die restlichen Fische in der Kammer sollten nicht gewogen werden.
46. Nicht gefressenes Futter und Exkremente sollten täglich aus den Prüfkammern entfernt werden, und zwar kurz nach der Fütterung (innerhalb von 30 Minuten bis 1 Stunde). Die Kammern sollten während der gesamten Prüfungsdauer so sauber wie möglich gehalten werden, um die Konzentration organischer Stoffe möglichst gering zu halten (siehe Nummer 29), da das Vorhandensein von organischem Kohlenstoff die Bioverfügbarkeit des Prüfstoffs u. U. beeinträchtigen kann (12).
47. Da viele Futtersorten aus Fischmehl gewonnen werden, sollte sichergestellt werden, dass das Futter, beispielsweise aufgrund seines etwaigen Gehalts an Spuren von Pestiziden, Schwermetallen bzw. des Prüfstoffs als solchem, die Prüfungsergebnisse nicht beeinflusst oder Schädigungen auslöst.

Licht und Temperatur

48. Es wird eine Photoperiode von 12 bis 16 Stunden empfohlen, und die Temperatur (± 2 °C) sollte der Prüfspezies (siehe Anlage 3) angepasst sein. Art und Eigenschaften der Beleuchtung sollten bekannt sein. Eine mögliche Phototransformation des Prüfstoffs unter den Bestrahlungsbedingungen der Prüfung sollte berücksichtigt werden. Die Beleuchtung sollte so gewählt werden, dass eine Exposition der Fische gegenüber unnatürlichen Photoprodukten vermieden wird. In einigen Fällen mag die Verwendung eines Filters angebracht sein, um UV-Strahlungen unter 290 nm herauszufiltern.

Prüfkonzentrationen

49. Die Prüfung wurde ursprünglich für unpolare organische Stoffe entwickelt. Bei dieser Art von Stoffen wird davon ausgegangen, dass die Exposition der Fische gegenüber einer einzigen Konzentration ausreicht, da keine konzentrationsabhängigen Wirkungen erwartet werden, obwohl nach den geltenden Rahmenvorschriften möglicherweise zwei Konzentrationen erforderlich sind. Wenn Stoffe außerhalb dieses Bereichs geprüft werden oder andere Anzeichen einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit bekannt sind, sollte die Prüfung mit zwei oder mehr Konzentrationen durchgeführt werden. Wird nur eine Konzentration geprüft, ist die Verwendung dieser einzigen Konzentration zu begründen (siehe Nummer 79). Zudem sollte die Prüfkonzentration so niedrig wie praktisch oder technisch möglich sein (d. h. nicht nahe der Löslichkeitsgrenze liegen).
50. In bestimmten Fällen kann davon ausgegangen werden, dass die Biokonzentration eines Stoffs von der Wasserkonzentration abhängt (z. B. bei Metallen, deren Aufnahme durch die Fische sich zumindest teilweise kontrollieren lässt). In solchen Fällen müssen mindestens zwei, vorzugsweise aber mehr Konzentrationen geprüft werden (siehe Nummer 49), die unter Umweltgesichtspunkten relevant sind. Auch für Stoffe, bei denen die Prüfkonzentrationen aus praktischen Gründen nahe der Löslichkeitsgrenze liegen müssen, wird die Prüfung mit mindestens zwei Konzentrationen empfohlen, da dies einen Einblick in die Zuverlässigkeit der Expositionskonzentrationen gibt. Die gewählten Prüfkonzentrationen sollten die ökologisch realistische Konzentration sowie die Konzentration umfassen, die für die Zwecke der jeweiligen Bewertung relevant ist.
51. Die Prüfstoffkonzentration(en) sollte(n) so gewählt werden, dass sie unter ihrem chronischen Wirkungsniveau oder unter 1 % ihres akuten asymptotischen LC_{50} -Werts, innerhalb eines unter Umweltgesichtspunkten relevanten Bereichs sowie mindestens eine Zehnerpotenz über ihrer für die angewandte Analyseverfahren maßgeblichen Quantifizierungsgrenze in Wasser liegen. Die höchstzulässige Prüfkonzentration kann auch ermittelt werden, indem der akute 96-h- LC_{50} -Wert durch ein angemessenes Akut/Chronisch-Verhältnis dividiert wird (z. B. liegt der Quotient bei bestimmten Stoffen bei 3, bei einigen wenigen jedoch über 100). Wird eine zweite Konzentration verwendet, sollte sie um Faktor 10 von der nächsthöheren Konzentration abweichen. Sollte dies aufgrund des Toxizitätskriteriums (das die obere Prüfkonzentration begrenzt) und der analytischen Grenze (die die untere Testkonzentration begrenzt) nicht möglich sein, kann ein Faktor unter 10 gewählt und die Verwendung eines radioaktiv markierten Stoffes (von höchster Reinheit; z. B. vorzugsweise > 98 %) sollte in Erwägung gezogen werden. Es ist darauf zu achten, dass keine der verwendeten Konzentrationen die Löslichkeitsgrenze des Prüfstoffs in den Prüfmedien überschreitet.

Kontrollen

52. Zusätzlich zu den Versuchsreihen sollte eine Verdünnungswasserkontrolle bzw. (siehe Nummern 30 und 31) eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel angelegt werden.

Häufigkeit der Wasserqualitätsmessungen

53. Während der Prüfung sollten der gelöste Sauerstoff, der TOC, der pH-Wert und die Temperatur in allen Prüf- und Kontrollgefäßen gemessen werden. Die Gesamthärte und (ggf.) die Salinität sollten in der (den) Kontrolle(n) und in einem Prüfgefäß gemessen werden. Werden zwei oder mehr Konzentrationen geprüft, sind diese Parameter bei der höheren (oder höchsten) Konzentration zu messen. Der gelöste Sauerstoff und (ggf.) die Salinität sollten mindestens dreimal – zu Beginn, ungefähr in der Mitte und am Ende der Aufnahme-Phase – sowie einmal pro Woche in der Ausscheidungsphase gemessen werden. Der TOC sollte zu Beginn der Prüfung (24 bzw. 48 Std. vor Beginn der Prüfung oder der Aufnahme-Phase), bevor die Fische eingesetzt werden, und sowohl während der Aufnahme- als auch der Ausscheidungsphase mindestens einmal pro Woche gemessen werden. Die Temperatur sollte täglich gemessen und protokolliert werden, der pH-Wert zu Beginn und am Ende jeder Prüfungsphase und die Härte einmal pro Prüfung. Die Temperatur sollte in mindestens einem Gefäß möglichst kontinuierlich überprüft werden.

Beprobung von Fischen und Wasser

Probenahmeplan für Fische und Wasser

54. Vor dem Einsatz der Fische sowie während der Aufnahme- und Ausscheidungsphase ist den Prüfkammern Wasser zur Bestimmung der Prüfstoffkonzentration zu entnehmen. Die Wasserproben sollten gleichzeitig mit den Fischproben vor deren Fütterung entnommen werden. Eine häufigere Probenahme kann sinnvoll sein, um stabile Konzentrationen nach dem Einsetzen der Fische zu gewährleisten. Während der Aufnahme-Phase sollten die Prüfstoffkonzentrationen bestimmt werden, um Übereinstimmung mit den Validitätskriterien zu gewährleisten (Nummer 24). Wenn in Wasserproben zu Beginn der Ausscheidungsphase kein Prüfstoff nachzuweisen ist, kann dies rechtfertigen, dass in der restlichen Ausscheidungsphase kein Prüf- und Kontrollwasser auf Prüfstoff gemessen wird.
55. Während der Aufnahme-Phase sollten mindestens fünf, während der Ausscheidungsphase mindestens vier Fischproben für die Untersuchung auf Prüfstoff entnommen werden. Da es in manchen Fällen schwierig sein wird, anhand dieser Probenzahl eine einigermaßen genaue Schätzung des BCF vorzunehmen (insbesondere wenn es sich nicht um eine reine Aufnahme- und Ausscheidungskinetik erster Ordnung handelt), kann es ratsam sein, in beiden Phasen häufiger Proben zu entnehmen (siehe Anlage 4).

56. Der Lipidgehalt sollte zumindest zu Anfang und am Ende der Aufnahme- sowie am Ende der Ausscheidungsphase anhand desselben biologischen Materials bestimmt werden, das auch zur Bestimmung der Prüfstoffkonzentration verwendet wird. Ist dies nicht machbar, sollte der Lipidgehalt bei drei separaten Fischen an jedem der drei Endpunkte bestimmt werden. Die Anzahl Fische pro Behälter sollte zu Beginn der Prüfung entsprechend angepasst werden¹. Alternativ können, wenn in Kontrollfischen (d. h. Fischen aus der Stammpopulation) keine erheblichen Prüfstoffmengen nachgewiesen werden, die Kontrollfische der Prüfung ausschließlich auf Lipidgehalt untersucht werden, und die Prüfstoffanalyse in der (den) Prüfgruppe(n) (und die zugehörigen Werte der Aufnahmekonstante, der Ausscheidungskonstante und des BCF) können um Veränderungen des Lipidgehalts der Kontrollgruppe während der Prüfung korrigiert werden⁽²⁾.
57. Tote oder kranke Fische sollten nicht auf Prüfstoffkonzentration oder Lipidgehalt untersucht werden.
58. Ein Beispiel für einen denkbaren Probenahmeplan wird in Anlage 4 gegeben. Mithilfe anderer hypothetischer K_{OW} -Werte lassen sich leicht andere Beprobungspläne festlegen, um die für eine Aufnahme von 95 % erforderliche Expositionsdauer zu berechnen (für Berechnungen siehe Anlage 5).
59. Die Beprobung sollte während der Aufnahme-Phase so lange fortgesetzt werden, bis der stationäre Zustand erreicht ist (für Definitionen und Einheiten siehe Anlage 1) oder die Ausscheidungsphase auf andere Weise beendet wird (nach 28 oder 60 Tagen, siehe Nummern 37 und 38). Vor Beginn der Ausscheidungsphase sollten die Fische in saubere Gefäße umgesetzt werden.

Probenahme und Probenvorbereitung

60. Wasserproben für die Analyse sollten z. B. durch Absaugen durch eine inerte Schlauchleitung an einem zentralen Punkt der Prüfkammer gezogen werden. Der nicht-bioverfügbare Teil der Prüfstoffe kann offensichtlich nicht immer durch Filtrieren oder Zentrifugieren vom bioverfügbaren Teil getrennt werden. Bei Anwendung einer Trennungstechnik sollte diese angesichts der genannten Probleme stets im Prüfbericht

(1) Wird der Lipidgehalt nicht bei denselben Fischen bestimmt, wie dies beim Prüfstoff der Fall ist, sollten die Fische zumindest ein ähnliches Gewicht besitzen und (ggf.) vom gleichen Geschlecht sein.

(²) Diese Alternative gilt nur, wenn die Fische in allen Prüfgruppen in vergleichbarer Größenordnung gehalten, nach demselben Schema entfernt und auf dieselbe Weise gefüttert werden. Dies gewährleistet, dass das Fischwachstum in allen Gruppen vergleichbar ist, wenn die geprüfte Konzentration unterhalb des toxischen Bereiches liegt. Es wird davon ausgegangen, dass bei vergleichbarem Wachstum auch der Lipidgehalt ähnlich ist. Wachstumsunterschiede in der Kontrolle würden auf eine stoffbedingte Wirkung hindeuten und die Studie invalidieren.

begründet oder validiert werden (25). Insbesondere bei stark hydrophoben Stoffen (d. h. Stoffen mit einem $\log K_{OW} > 5$) (12) (26), bei denen es zu Adsorption an die Filtermatrix oder an die Zentrifugationsgefäße kommen könnte, sollten die Proben diesen Verfahren nicht unterzogen werden. Stattdessen sollten Vorkehrungen getroffen werden, um die Behälter so sauber wie möglich zu halten (siehe Nummer 46), und der Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff sollte sowohl während der Aufnahme- als auch während der Ausscheidungsphase kontrolliert werden (siehe Nummer 53). Zur Vermeidung möglicher Probleme aufgrund geringerer Bioverfügbarkeit kann die Probenahme bei schwer löslichen und stark hydrophoben Stoffen durch Festphasen-Mikroextraktion erfolgen.

61. Die beprobten Fische sollten unverzüglich auf geeignete und humane Weise getötet werden (bei Messungen ganzer Fische sollten diese nur mit Wasser abgespült (siehe Nummer 28) und trocken getupft werden). Die Fische sollten gewogen und ihre Gesamtlänge sollte gemessen werden⁽¹⁾. Bei jedem einzelnen Fisch sollten die Gewichts- und Längenmessungen der gemessenen Stoffkonzentration (und ggf. dem Lipidgehalt) zugeordnet werden, z. B. mithilfe eines individuellen Kenncodes für jeden beprobten Fisch.
62. Die Analyse der Fisch- und Wasserproben sollte vorzugsweise direkt nach der Probenahme erfolgen, um Degradation oder sonstige Verluste zu vermeiden und während der Prüfung die ungefähren Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten berechnen zu können. Eine unverzügliche Analyse verhindert auch, dass ein Plateau (stationärer Zustand) erst spät bestimmt wird.
63. Kann keine sofortige Analyse erfolgen, sollten die Proben auf geeignete Weise gelagert werden. Informationen zur für den betreffenden Prüfstoff geeigneten Lagerungsmethode – beispielsweise Tiefkühlung, Lagerung bei 4 °C, Extraktion usw. – sollten vor Beginn der Prüfung eingeholt werden. Die Dauer der Lagerung sollte gewährleisten, dass sich der Stoff während der Lagerung nicht verschlechtert.

Qualität der Analysemethode

64. Da das gesamte Verfahren im Wesentlichen von der Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit der auf den Prüfstoff angewandten Analysemethoden abhängt, muss in Versuchen überprüft werden, ob die betreffende Methode in Bezug auf Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse sowie Wiederfindung des Prüfstoffs in Wasser und Fischen geeignet ist. Dies sollte im Rahmen von Vorversuchen

⁽¹⁾ Zusätzlich zum Gewicht sollte auch die Gesamtlänge protokolliert werden, da ein Vergleich des Längenwachstums während des Versuchs ein geeigneter Indikator einer Schädigung ist.

geschehen. Zudem muss sichergestellt werden, dass der Prüfstoff im verwendeten Verdünnungswasser nicht nachweisbar ist. Erforderlichenfalls müssen die Prüfstoffkonzentrationen in Wasser und in den Fischen um die Wiederfindungs- und Hintergrundwerte der Kontrollen berichtigt werden. Die Fisch- und Wasserproben sollten stets so behandelt werden, dass Verunreinigungen und Verluste (z. B. infolge von Adsorption an das Probenahmegerät) auf ein Mindestmaß begrenzt sind.

Analyse der Fischproben

65. Werden für den Test radioaktiv markierte Materialien verwendet, können die Proben entweder auf ihre gesamte radioaktive Markierung analysiert werden (d. h. Ausgangsstoff und Metaboliten) oder aber gereinigt werden, damit der Ausgangsstoff separat untersucht werden kann. Soll der BCF auf dem Ausgangsstoff basieren, sollten die Hauptmetaboliten zumindest am Ende der Aufnahme phase bestimmt werden (siehe Nummer 6). Hauptmetaboliten sind jene, die mindestens 10 % der Gesamtrückstände in Fischgeweben entsprechen, die mindestens 5 % an zwei aufeinanderfolgenden Probenahmezeitpunkten entsprechen, die steigende Werte während der Aufnahme phase zeigen und die bekanntermaßen toxikologisch bedenklich sind. Wenn der BCF für den ganzen Fisch bezogen auf die gesamten radioaktiv markierten Rückstände ≥ 500 beträgt, ist es u. U. ratsam – und bei gewissen Kategorien von Stoffen wie Pestiziden unbedingt empfehlenswert – die Hauptmetaboliten zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Quantifizierung solcher Metabolite wird von bestimmten Regulierungsbehörden möglicherweise gefordert. Wenn die Abbauprodukte, die ≥ 10 % des gesamten radioaktiv markierten Rückstands in den Fischgeweben ausmachen, identifiziert und quantifiziert werden, dann sollten auch die Abbauprodukte im Prüfwasser identifiziert und quantifiziert werden. Ist dies nicht machbar, sollte dies im Prüfbericht erläutert werden.
66. Die Konzentration des Prüfstoffes wird normalerweise für jeden gewogenen Fisch einzeln bestimmt. Ist dies nicht möglich, können die Proben jedes Probenahmevorgangs gepoolt werden, doch beschränkt dies die statistischen Verfahren, die auf die Daten angewendet werden können, sodass im Test eine Anzahl Fische eingesetzt werden muss, die dem Pooling, dem statistischen Verfahren und der gewünschten Aussagekraft Genüge leistet. Die Referenzdokumente (27) und (28) können als Einführung in relevante Pooling-Verfahren konsultiert werden.
67. Der BCF sollte auf einen Fisch mit 5 % Lipidgehalt (basierend auf dem Nassgewicht) standardisiert und nicht nur bezogen auf das aus der Studie direkt abgeleitete Körpergewicht ausgedrückt werden (siehe Nummer 21), es sei denn, es kann argumentiert werden, dass der Prüfstoff nicht überwiegend in Lipiden akkumuliert. Der Lipidgehalt der Fische sollte möglichst bei jeder Probenahme bestimmt werden, vorzugsweise an dem Extrakt, das für die Untersuchung des Prüfstoffes hergestellt wurde, da die Lipide häufig erst aus dem Extrakt entfernt werden müssen, bevor dieses chromatographisch analysiert

werden kann. Jedoch erfordert die Analyse der Prüfstoffe häufig spezifische Extraktionsverfahren, die den Prüfmethode zur Bestimmung des Lipidgehalts zuwiderlaufen können. In diesem Fall (bis geeignete zerstörungsfreie instrumentelle Methoden verfügbar sind) wird die Anwendung einer anderen Strategie zur Bestimmung des Lipidgehalts von Fischen empfohlen (siehe Nummer 56). Zur Bestimmung des Lipidgehalts sollten geeignete Methoden angewendet werden (20). Das Chloroform/Methanol-Extraktionsverfahren (29) bietet sich als Standardmethode an (30), als alternatives Verfahren ist die Smedes-Methode (31) geeignet. Letztere zeichnet sich durch vergleichbare Extraktionseffizienz, hohe Genauigkeit, den Einsatz weniger toxisch wirkender organischer Lösungsmittel und einfache Durchführung aus. Andere Methoden, deren Genauigkeit im Vergleich zu den empfohlenen Methoden gut ist, könnten ebenfalls angewendet werden, sofern dies entsprechend begründet wird. Wichtig ist, dass die angewandte Methode präzisiert wird.

Messung des Fischwachstums

68. Bei Prüfungsbeginn sind 5-10 Fische aus der Stammpopulation einzeln zu wiegen und ihre Gesamtlänge ist zu messen. Dies können dieselben Fische sein, die für die Bestimmung des Lipidgehalts verwendet werden (siehe Nummer 56). Das Gewicht und die Länge von Fischen, die je Probenahme aus den Prüf- und Kontrollgruppen entnommen werden, sollten vor der chemischen oder der Lipidanalyse gemessen werden. Anhand der Messwerte aus diesen Fischproben lassen sich Gewicht und Länge der in den Prüf- und Kontrollbehältern verbleibenden Fische abschätzen (siehe Nummer 45).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

69. Die Aufnahmeurve für den Prüfstoff ergibt sich, indem seine Konzentration in/auf den Fischen (oder bestimmten Geweben) in der Aufnahmephase auf eine arithmetischen Skala gegen die Zeit aufgetragen wird. Hat die Kurve ein Plateau erreicht, d. h. ist sie nahezu asymptotisch zur Zeitachse, sollte der BCF im stationären Zustand (BCF_{ss}) nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\frac{C_f \text{ bei stationärem Zustand (Mittelwert)}}{C_w \text{ bei stationärem Zustand (Mittelwert)}}$$

Die Entwicklung von C_f kann durch das Fischwachstum beeinflusst werden (Nummern 72 und 73). Die mittlere Expositionskonzentration (C_w) unterliegt Schwankungen im Zeitverlauf. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine zeitgewichtete durchschnittliche Konzentration bei Bioakkumulationsstudien relevanter und genauer ist, selbst wenn die Schwankung innerhalb des entsprechenden Validitätsbereichs liegt (siehe Nummer 24). Für

die Berechnung einer zeitgewichteten durchschnittlichen Wasserkonzentration siehe Anlage 5 Abschnitt 1.

70. Der kinetische Biokonzentrationsfaktor (BCF_K) sollte als Quotient k_1/k_2 , den beiden kinetischen Konstanten erster Ordnung, ermittelt werden. Die Konstanten k_1 und k_2 sowie der BCF_K können durch gleichzeitiges Anpassen der Aufnahme- und der Ausscheidungsphase abgeleitet werden. Alternativ können k_1 und k_2 nacheinander bestimmt werden (siehe Anlage 5 (für Beschreibung und Vergleich dieser Methoden siehe Anlage 5)). Die Ausscheidungskonstante (k_2) muss ggf. um die Verdünnung durch Wachstum korrigiert werden (siehe Nummern 72 und 73). Wenn die Aufnahme- und/oder die Ausscheidungskurve eindeutig keiner Kinetik erster Ordnung folgen, sollten komplexere Modelle verwendet (siehe Referenzen in Anlage 5) und der Rat eines Biostatistikers eingeholt werden.

Daten zu Fischgewicht/-länge

71. Während der Aufnahme- und der Ausscheidungsphase werden zu jedem Probenahmezeitpunkt die Nassgewichte und Gesamtlängen der einzelnen Fische (einschließlich der Stammpopulation zu Beginn der Aufnahme), aufgeschlüsselt nach Test- und Kontrollgruppen, tabellarisch erfasst. Bei jedem einzelnen Fisch sollten die Gewichts- und die Längenmessung der analysierten Stoffkonzentration zugeordnet werden, z. B. mithilfe eines individuellen Kenncodes für jeden untersuchten Fisch. Das Gewicht ist der bevorzugte Wachstumsparameter zur Korrektur der kinetischen BCF-Werte um die Verdünnung durch Wachstum (für die Methode zur Korrektur der Daten um die Verdünnung durch Wachstum siehe Nummer 73 und Anlage 5).

Korrektur um die Verdünnung durch Wachstum und Lipidstandardisierung

72. Das Fischwachstum während der Ausscheidungsphase kann die gemessenen Stoffkonzentrationen in den Fischen verringern, sodass die Gesamtausscheidungskonstante (k_2) größer ist als sie bei den Ausscheidungsprozessen (z. B. Atmung, Metabolismus, Egestion) alleine wäre. Die kinetischen Biokonzentrationsfaktoren sollten um die Verdünnung durch Wachstum korrigiert werden. Ein BCF_{SS} wird ebenfalls durch das Wachstum beeinflusst, doch existiert kein anerkanntes Verfahren für die Korrektur eines BCF_{SS} um das Wachstum. In Fällen erheblichen Wachstums sollte der BCF_K , der um das Wachstum korrigiert wurde (BCF_{Kg}), ebenfalls abgeleitet werden, da dies ein aussagekräftigeres Maß für den Biokonzentrationsfaktor sein kann. Der Lipidgehalt von Versuchsfischen (der eng mit der Bioakkumulation von hydrophoben Stoffen) assoziiert wird, kann in der Praxis variieren, sodass eine Standardisierung auf einen bestimmten Lipidgehalt (5 % w/w) erforderlich ist, um sowohl den kinetischen Biokonzentrationsfaktor als auch den Biokonzentrationsfaktor bei stationärem Zustand auf sinnvolle Weise darzustellen, es sei denn, es kann argumentiert werden, dass der Prüfstoff nicht hauptsächlich in Lipiden akkumuliert (z. B. können sich bestimmte perfluorierte

Stoffe an Proteine binden). Für Gleichungen und Beispiele für diese Berechnungen siehe Anlage 5.

73. Um einen kinetischen BCF um die Verdünnung durch Wachstum zu korrigieren, sollte die Ausscheidungskonstante um das Wachstum korrigiert werden. Diese wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante (k_{2g}) wird berechnet durch Subtraktion der Wachstumskonstante (k_g , wie aus den gemessenen Gewichtsdaten bestimmt) von der Gesamtausscheidungskonstante (k_2). Anschließend wird der wachstumskorrigierte kinetische Biokonzentrationsfaktor durch Division der Aufnahmekonstante (k_1) durch die wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante (k_{2g}) berechnet (siehe Anlage 5). In bestimmten Fällen funktioniert dieser Ansatz nur bedingt. Beispielsweise kann bei Prüfstoffen, die sehr langsam ausgeschieden werden, die abgeleitete Konstante k_{2g} bei wachsenden Fischen sehr klein sein, weshalb der Fehler bei den beiden Konstanten, die zur Ableitung verwendet wurden, kritisch wird und k_g -Schätzungen in bestimmten Fällen möglicherweise größer als k_2 sind. Ein alternativer Ansatz, bei dem die Notwendigkeit einer Korrektur um die Verdünnung durch Wachstum umgangen wird, besteht darin, anstelle der üblichen Daten über die Prüfstoffmasse pro Fischmasseneinheit (Konzentration) Daten über die Prüfstoffmasse pro Fischeausscheidung (basierend auf ganzen Fischen) zu verwenden. Dies lässt sich einfach bewerkstelligen, da bei Versuchen, die nach dieser Prüfmethode durchgeführt werden, protokollierte Gewebekonzentrationen einzelnen Fischgewichten zugeordnet werden sollten. Dieses einfache Verfahren wird in Anlage 5 beschrieben. Es ist zu beachten, dass k_2 auch bei Anwendung dieses alternativen Ansatzes angegeben werden sollte.
74. Der kinetische Biokonzentrationsfaktor und der Biokonzentrationsfaktor bei stationärem Zustand sollten ebenfalls bezogen auf einen Standard-Lipidgehalt von Fischen von 5 % (w/w) angegeben werden, es sei denn, es kann argumentiert werden, dass der Prüfstoff nicht vorwiegend in Lipiden akkumuliert. Daten über die Konzentration im Fisch oder der BCF sind entsprechend dem Verhältnis zwischen 5 % und dem tatsächlichen durchschnittlichen Lipidgehalt eines Fisches (in % Nassgewicht) zu standardisieren (siehe Anlage 5).
75. Wurden die chemische Analyse und die Lipidanalyse an ein und demselben Fisch durchgeführt, sollten diese lipidstandardisierten Daten für einzelne Fische bei der Berechnung eines lipidstandardisierten BCF berücksichtigt werden. Alternativ ist es möglich, soweit es das Wachstum bei Kontroll- und Versuchsfischen vergleichbar ist, nur den Lipidgehalt von Kontrollfischen für die Lipidkorrektur zu verwenden (siehe Nummer 56). Eine Methode zur Berechnung eines lipidstandardisierten BCF ist in Anlage 5 beschrieben.

Interpretation der Ergebnisse

76. Wenn die gemessenen Prüflösungskonzentrationen an der Nachweisgrenze der Analysemethode liegen, sollten die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden.
77. Das Durchschnittswachstum der Prüf- und Kontrollgruppen sollte grundsätzlich nicht allzu stark variieren, um toxische Wirkungen auszuschließen. Die Wachstumskonstanten oder die Wachstumskurven der beiden Gruppen sollten nach einem geeigneten Verfahren miteinander verglichen werden⁽¹⁾.
78. Gut definierte Aufnahme- und Ausscheidungskurven weisen auf eine gute Qualität der Biokonzentrationsdaten hin. Bei den Konstanten sollte ein χ^2 *Goodness-of-Fit*-Test eine gute Anpassung (d. h. einen kleinen Messfehlerprozentsatz (32)) für das Bioakkumulationsmodell ergeben, damit die Konstanten als zuverlässig angesehen werden können (siehe Anlage 5). Werden mehrere Prüfkonzentrationen verwendet, sollte die Schwankung der Aufnahme-/Ausscheidungskonstanten zwischen den Testkonzentrationen weniger als 20 %⁽²⁾ betragen. Ist dies nicht der Fall, könnte dies auf eine Abhängigkeit von der Konzentration hindeuten. Werden erhebliche Unterschiede bei den Aufnahme-/Ausscheidungskonstanten zwischen den verwendeten Prüfkonzentrationen beobachtet, sollten diese dokumentiert und möglichst begründet werden. Bei einem guten Versuchsplan liegt die 95 %-Konfidenzgrenze des BCF in der Regel bei ungefähr ± 20 % des errechneten BCF.
79. Werden zwei oder mehr Konzentrationen geprüft, wird anhand der Ergebnisse der beiden oder aller Konzentrationen kontrolliert, ob die Ergebnisse übereinstimmend sind und eine Konzentrationsabhängigkeit besteht. Wird nur eine einzige Konzentration geprüft, um die Verwendung von Tieren und/oder Ressourcen zu verringern, sollte die Verwendung dieser einzigen Konzentration begründet werden.
80. Der resultierende BCF_{SS} ist zweifelhaft, wenn der BCF_K erheblich größer ist als der BCF_{SS} , da dies darauf hindeuten kann, dass kein stationärer Zustand erreicht wurde oder die Verdünnung durch Wachstum sowie Ausscheidungsprozesse nicht berücksichtigt wurden. In Fällen, in denen der BCF_{SS} wesentlich größer ist als der BCF_K , sollte die Ableitung der Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten auf Fehler überprüft und neu evaluiert werden. Die Schätzung des BCF_K lässt sich möglicherweise durch ein anderes Anpassungsverfahren verbessern (siehe Anlage 5).

⁽¹⁾ Es kann ein *t*-Test an Wachstumskonstanten durchgeführt werden, um festzustellen, ob es zwischen Kontroll- und Prüfgruppen Wachstumsunterschiede gibt, oder aber ein *F*-Test im Falle einer Varianzanalyse. Ein *F*-Test oder *Likelihood-Ratio*-Test kann die Auswahl des geeigneten Wachstumsmodells vereinfachen (OECD Monograph 54 (32)).

⁽²⁾ Diese Prozentsätze setzen voraus, dass die Analysemethoden zuverlässig sind und die Halbwertszeit < 14 Tage beträgt. Wenn die Analysemethoden weniger zuverlässig sind oder die Halbwertszeit (erheblich) verlängert ist, werden diese Zahlen größer.

Prüfbericht

81. Abgesehen von den Angaben zum Prüfstoff unter Nummer 3 muss der Prüfbericht folgende Informationen enthalten:

Prüfstoff:

Physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;

- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw. (einschließlich des Gehalts an organischem Kohlenstoff, falls zutreffend);
- bei mehrkomponentigen Stoffen und UVCB-Stoffen (chemische Stoffe unbekannter oder variabler Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte und biologische Materialien): Beschreibung, soweit möglich, der chemischen Identität der Einzelkomponenten und jeweils des Prozentsatzes der Gesamtmasse des Stoffs. Es sollte zusammengefasst werden, inwieweit die bei der Prüfung verwendete Analysemethode ein Maß für die Konzentration des Stoffes ist; alle Analysemethoden sollten mit Angaben zu Genauigkeit, Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze beschrieben werden;
- im Falle der radioaktiven Markierung: die exakte Position der markierten Atome und der prozentuale Anteil der auf Verunreinigungen zurückgeführten Radioaktivität;
- Angaben zur Toxizität des Prüfstoffs in Fischen (idealerweise die Prüfspezies). Die Toxizität sollte als akuter 96-h-LC₅₀-Wert sowie als NOAEC- und LOAEC-Wert aus einer Langzeitstudie (*d. h.* einem Test im frühen Entwicklungsstadium oder einem Test, der den gesamten Lebenszyklus abdeckt, falls verfügbar) angegeben werden;
- Lagerbedingungen und Stabilität der Prüfchemikalie oder des Prüfstoffs unter Lagerbedingungen, falls diese vor der Verwendung gelagert werden.

Prüfspezies:

Wissenschaftlicher Name, Stamm, Herkunft, etwaige Vorbehandlungen, Akklimatisierung, Alter, Geschlecht (falls relevant), Größenbereich (Gewicht und Länge) usw.;

Prüfbedingungen:

- angewandtes Prüfverfahren (z. B. Durchflussverfahren, semistatisches Verfahren); vollständiger oder minimierter Versuch (einschließlich Begründung und Rechtfertigung);
- Art und Eigenschaften der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n);
- Versuchsplan (z. B. Zahl und Größe der Prüfkammern, Wasservolumen-Austauschrate, Besatzrate, Zahl der Replikate, Anzahl Fische pro Replikat, Zahl der Prüfkonzentrationen,

Dauer der Aufnahme- und Ausscheidungsphase, Häufigkeit der Entnahme von Fisch- und Wasserproben);

- Methode der Vorbereitung der Stammlösungen und Erneuerungshäufigkeit (falls verwendet, müssen Angaben zum Lösungsmittel, seiner Konzentration und seinem Beitrag zum organischen Kohlenstoffgehalt des Prüfwassers gemacht werden) oder Beschreibung des alternativen Dosierungssystems;
- die nominellen Prüfkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte sowie deren Standardabweichungen in den Prüfbehältern sowie das Verfahren, nach dem diese ermittelt wurden;
- Herkunft des Verdünnungswassers, Beschreibung etwaiger Vorbehandlungen, Ergebnisse etwaiger Nachweise, dass die Versuchsfische in dem Wasser überleben können, sowie Wassereigenschaften: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), TOC, suspendierte Feststoffe, Salinität des Prüfmediums (gegebenenfalls) sowie die Ergebnisse aller anderen durchgeführten Messungen;
- Wasserqualität innerhalb der Prüfbehälter, pH-Wert, Härte, TOC, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs; Messverfahren und -häufigkeit;
- ausführliche Angaben zur Fütterung, z. B. Art des Futters, Herkunft, Zusammensetzung (zumindest der Lipid- und Proteingehalt, falls möglich), gewählte Fütterungsrate, Futtermenge und Häufigkeit;
- Angaben zur Behandlung der Fisch- und Wasserproben, einschließlich Einzelheiten zu Vorbereitung, Lagerung, Extraktion und Analyseverfahren (und -genauigkeit) für den Prüfstoff und den Lipidgehalt;
- angewandte Methoden zur Randomisierung der Behandlung und Zuordnung der Fische zu den Prüfbehältern;
- Datum des Einsatzes der Prüforganismen in die Prüflösungen und Prüfungsdauer;
- Beschreibung der Dosisfindungstests und der Ergebnisse, falls verfügbar.

Ergebnisse:

- Ergebnisse etwaiger Vorversuche;
- Mortalität der Kontrollfische und der Fische in den einzelnen Expositionskammern sowie etwa beobachtete Verhaltensanomalien;
- Beschreibung etwa festgestellter Schadwirkungen;
- vollständige Beschreibung aller angewandten chemischen Analyseverfahren, einschließlich Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen, Variabilität und Wiederfindung;
- Lipidgehalt der Fische, einschließlich der angewandten Methode, und Lipidstandardisierungsfaktor (L_n , Faktor zur Angabe der Ergebnisse bezogen auf einen Lipidgehalt von 5 %), falls abgeleitet;
- tabellarisch dargestellte Daten zu Fischgewicht (und -länge), bezogen auf die Chemikalienkonzentrationen in den einzelnen Fischen (und den Lipidgehalt, falls zutreffend), sowohl für die Kontroll- als auch die Expositiongruppen (z. B. unter

Verwendung von individuellen Kenncodes für jede Fischprobe) und Berechnungen der abgeleiteten Wachstumskonstante(n);

- tabellarisch dargestellte Daten zur Prüfstoffkonzentration in den Fischen (C_f , bezogen auf einzelnen Fische) und im Wasser (C_w) (gegebenenfalls mit Mittelwerten für Prüf- und Kontrollgruppe, Standardabweichung und Abweichungsbereich) für alle Probenahmen (wobei C_f in mg/kg Nassgewicht des Ganzkörpers oder bestimmter Gewebe, z. B. Lipid, und C_w in mg/l ausgedrückt wird). Auch die C_w -Werte für die Kontrollreihe (Hintergrund) sollten dokumentiert werden;
- Kurven (einschließlich aller gemessenen Daten), aus denen Folgendes hervorgeht (falls zutreffend, können die Konzentrationen bezogen auf den Ganzkörper und den Lipidgehalt normalisiert auf 5 % des Fisches oder bestimmter Fischgewebe ausgedrückt werden):
 - Wachstum, *d. h.* Fischgewicht im Verhältnis zur Zeit oder durch natürliches Logarithmieren transformiertes Gewicht im Verhältnis zur Zeit (einschließlich der abgeleiteten Wachstumskonstante, k_g);
 - Aufnahme und Ausscheidung des Prüfstoffs durch die Fische (in einem Diagramm);
 - Zeit zum stationären Zustand (falls erreicht);
 - durch natürliches Logarithmieren transformierte Konzentration im Verhältnis zur Dauer der Aufnahmeperiode (einschließlich der abgeleiteten Aufnahmekonstanten k_1);
 - durch natürliches Logarithmieren transformierte Konzentration ($\ln(\text{Konzentration})$) im Verhältnis zur Dauer der Ausscheidungsphase (einschließlich der abgeleiteten Ausscheidungskonstanten k_2); und
 - Aufnahme- und Ausscheidungskurve, aus denen sowohl die Daten als auch das angepasste Modell hervorgehen.
- Werden bei einer visuellen Überprüfung einer grafischen Darstellung „Ausreißer“ festgestellt, kann ein statistisch gültiger Ausreißertest durchgeführt werden, um falsche Datenpunkte zu entfernen; die Gründe für die Auslassung solcher Punkte sind zu dokumentieren.
- der Biokonzentrationsfaktor bei stationärem Zustand (BCF_{SS}), d. h. wenn der stationäre Zustand (fast) erreicht ist;
- kinetischer Konzentrationsfaktor (BCF_K) sowie die abgeleiteten Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten k_1 und k_2 , zusammen mit den Varianzen in k_2 (Steigung und Achsenabschnitt) bei sequenzieller Anpassung;
- Konfidenzgrenzen, Standardabweichung (soweit verfügbar) sowie Berechnungs-/Datenanalyseverfahren für jeden Parameter bei jeder Konzentration des verwendeten Prüfstoffs;
 - etwaige Angaben zu radioaktiv markierten Prüfstoffmetaboliten und deren Akkumulation;

- Wachstumskonstante(n) (einschließlich 95 %-Konfidenzintervall(e)) und berechnete, um das Wachstum korrigierte Ausscheidungskonstante (k_{2g}), Halbwertszeit und BCF-Werte (BCF_{Kg});
- etwaige Besonderheiten im Zusammenhang mit dem Test, Abweichungen von den genannten Verfahren und andere relevante Informationen;
- nachstehende Übersichtstabelle mit wichtigen gemessenen und berechneten Daten:

Stoffbezogene Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten und Biokonzentrationsfaktoren (BCF)	
k_g (Wachstumskonstante, Tag ⁻¹):	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (Gesamtaufnahmekonstante; l kg ⁻¹ Tag ⁻¹):	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (Gesamtausscheidungskonstante, Tag ⁻¹):	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante, Tag ⁻¹):	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (Stoffkonzentration im Fisch bei stationärem Zustand; mg kg ⁻¹):	Wert eintragen ± SD ⁽²⁾
C_w (Stoffkonzentration im Wasser; mg l ⁻¹):	Wert eintragen ± SD ⁽²⁾
L_n (Lipidstandardisierungsfaktor):	Wert eintragen ⁽³⁾
BCF_{SS} (BCF bei stationärem Zustand; l kg ⁻¹)	Wert eintragen ± SD ⁽²⁾
BCF_{SSL} (lipidstandardisierter BCF bei stationärem Zustand; l kg ⁻¹)	Wert eintragen ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF_K (kinetischer BCF; l kg ⁻¹)	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF_K (wachstumskorrigierter kinetischer BCF; l kg ⁻¹)	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (wachstumskorrigierte Halbwertszeit; Tag):	Wert eintragen (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF_{KL} (lipidstandardisierter kinetischer BCF; l kg ⁻¹):	Wert eintragen
BCF_{KLG} (lipidstandardisierter, wachstumskorrigierter kinetischer BCF; l kg ⁻¹):	Wert eintragen

1) CI: Konfidenzintervall (falls schätzbar)

2) SD: Standardabweichung (falls schätzbar)

82. Ergebnisse der Art „an der Nachweis-/Quantifizierungsgrenze nicht nachweisbar/quantifizierbar“ sollten durch Versuche und einen entsprechenden Versuchsplan vermieden werden, da sie für die Berechnung der Konstanten nicht berücksichtigt werden können.

C.13 - II: Fischttest - Minimale aquatische Exposition

EINLEITUNG

83. Die zunehmende Erfahrung von Laboratorien und Regulierungsbehörden mit der Durchführung und Interpretation des vollständigen Tests zeigt, dass die Kinetik erster Ordnung – mit wenigen Ausnahmen – für die Schätzung der Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten geeignet ist, d. h. Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten können mit einem Minimum an Probenahme geschätzt und der kinetische BCF kann berechnet werden.
84. Der anfängliche Zweck der Prüfung alternativer Versuchspläne für BCF-Studien bestand darin, einen weniger komplexen Test zu entwickeln, der in einem Prüfzwischenschritt eingesetzt werden könnte, um BCF-Schätzwerte basierend auf K_{OW} und QSAR zu widerlegen oder zu bestätigen, und somit die Notwendigkeit einer vollständigen Prüfung für zahlreiche Stoffen zu vermeiden und die Kosten sowie den Einsatz von Tieren durch die Verringerung der Probenahmen und der Analysesequenzen auf ein Minimum zu beschränken. Wenngleich die wichtigsten Elemente des Versuchsplans der bisherigen Prüfmethode übernommen wurden, um die Einbeziehung der Prüfergebnisse in die vorhandenen BCF-Daten zu ermöglichen und die Prüfung sowie Auslegung der Daten zu erleichtern, bestand das Ziel darin, BCF-Schätzwerte von ausreichender Genauigkeit und Präzision für Risikobewertungsentscheidungen bereitzustellen. Es gelten vielfach dieselben Kriterien wie für die vollständige Prüfung, z. B. die Validitätskriterien (siehe Nummer 24) und Prüfungsabbruch, wenn am Ende der Aufnahme phase eine unerhebliche Aufnahme festgestellt wird (siehe Nummern 16 und 38).
85. Für einen Versuchsplan mit minimaler Exposition kämen generell Stoffe in Frage, für diese Prüfmethode grundsätzlich entwickelt wurde, d. h. unpolare organische Stoffe (siehe Nummer 49). Gibt es Anhaltspunkte dafür, dass der Prüfstoff ein abweichendes Verhalten zeigen könnte (z. B. eindeutige Abweichung von der Kinetik erster Ordnung), sollte zu regulatorischen Zwecke eine vollständige Prüfung durchgeführt werden.
86. Der minimierte Test dauert in der Regel ebenso lang wie der BCF-Standardtest durchgeführt, erfordert jedoch weniger Fischprobenahmen (für die Begründung siehe Anlage 6). Jedoch kann die Ausscheidungsphase bei schnell ausgeschiedenen Stoffen verkürzt werden, um zu vermeiden, dass die Konzentrationen in den Fischen vor Prüfungsende unter die Nachweis-/Quantifizierungsgrenze sinken. Mit einem Fischttest mit minimaler Exposition kann anhand einer einzigen Konzentration festgestellt werden, ob eine vollständige Prüfung durchgeführt werden muss oder nicht und ob die resultierenden Daten für die Berechnung der Konstanten und BCF robust genug sind (siehe Nummer 93). Auf eine vollständige Prüfung kann verzichtet werden, wenn die ermittelten BCF unter regulatorischen Gesichtspunkten in keiner Weise bedenklich sind.

87. In bestimmten Fällen kann es von Vorteil sein, den minimierten Test mit mehr als einer Prüfkonzentration als Vorversuch durchzuführen, um zu bestimmen, ob die BCF-Schätzwerte für einen bestimmten Stoff konzentrationsabhängig sind. Sollten die BCF-Schätzwerte aus dem minimierten Test eine Konzentrationsabhängigkeit zeigen, muss eine vollständige Prüfung durchgeführt werden. Ergibt der minimierte Test, dass die BCF-Schätzwerte nicht konzentrationsabhängig sind, die Ergebnisse jedoch nicht als schlüssig angesehen werden, könnte anschließend eine vollständige Prüfung mit einer Einzelkonzentration durchgeführt und die Zahl der benötigten Tiere im Vergleich zu einer vollständigen Prüfung mit zwei (oder mehr) Konzentrationen auf diese Weise verringert werden.

88. Stoffe, die potenziell für den minimierten Test in Frage kommen, sollten

- der Aufnahme- und Ausscheidungskinetik erster Ordnung möglichst folgen, z. B. abgeleitet aus Analogien mit ähnlichen Stoffen;
- einen $\log K_{OW} < 6$ aufweisen, es sei denn, es wird eine schnellere Metabolisierung erwartet⁽¹⁾;
- im Hinblick auf das Analyseverfahren hinreichend wasserlöslich sein (siehe Nummer 24);
- in den Fischen und im Wasser eindeutig quantifizierbar sein (d. h. die Konzentrationen sollten mindestens eine Zehnerpotenz über der Quantifizierungsgrenze liegen), wobei eine radioaktive Markierung empfohlen wird (siehe Nummer 23); und
- eine Ausscheidungsphase aufweisen, die länger als die prognostizierte Halbwertszeit ist (für Berechnungen siehe Anlage 5), oder die Dauer der Ausscheidungsphase sollte entsprechend angepasst werden (siehe Nummer 91). Eine Abweichung von dieser Regel ist zulässig, wenn von einer schnellen Metabolisierung ausgegangen wird.

PROBENAHRMEPLAN FÜR MINIMIERTE VERSUCHE

Beprobung der Fische

89. Die Entnahme von Fischproben wird auf vier Zeitpunkte reduziert:

- in der Mitte und am Ende der Aufnahmephase (letztere ist gleichzeitig auch der Beginn der Ausscheidungsphase), z. B. nach 14 und 28 Tagen (33);

⁽¹⁾ Kann tatsächlich von einer schnellen Metabolisierung ausgegangen werden, so kann dies *de facto* durch den minimierten Test nachgewiesen werden.

- in der Mitte der Ausscheidungsphase und bei Versuchsende (soweit die Stoffkonzentration $< 10\%$ der Höchstkonzentration beträgt, oder zumindest deutlich nach einer Halbwertszeit des Prüfstoffs), z. B. nach 7 und 14 Tagen der Ausscheidung (33). Wird eine schnelle Ausscheidung erwartet oder beobachtet, sollte die Ausscheidungsphase verkürzt werden, um zu vermeiden, dass die Konzentrationen in den Fischen unter die Quantifizierungsgrenze fallen;
- Lipidmessung wie bei der umfassenden Prüfung;
- Wachstumskorrektur wie bei der umfassenden Prüfung;
- der BCF wird als kinetischer BCF berechnet.

Wasserbeprobung

90. Beim minimierten Versuchsplan werden die Wasserproben wie bei der vollständigen Prüfung (siehe Nummer 54), mindestens jedoch fünf Mal in gleichen Zeitabständen über die Aufnahme- und Ausscheidungsphase verteilt, sowie in der Ausscheidungsphase wöchentlich entnommen.

Änderungen des Versuchsplans

91. Je nach Eigenschaften des Prüfstoffs, gültigen QSAR-Prognosen und des konkreten Versuchszwecks können Änderungen des Versuchsplans in Betracht gezogen werden:

- Ist mehr Präzision erforderlich, könnten mehr Fische (6 oder 8 anstatt 4) für die Probe am Ende der Aufnahme- und Ausscheidungsphase verwendet werden.
- Einbeziehung einer „Extragruppe“ von Fischen, wenn eine Ausscheidungsphase von 14 Tagen (oder das prognostizierte Ende der Ausscheidungsphase) für eine adäquate Ausscheidung (*d. h.* $> 50\%$) unzulänglich war. Wenn die prognostizierte Dauer der Ausscheidungsphase kürzer oder länger als 14 Tage ist, sollte der Probenahmeplan angepasst werden (*d. h.* eine Gruppe sollte am prognostizierten Ende der Ausscheidungsphase und eine zweite Gruppe nach der Halbwertszeit beprobt werden).
- Verwendung von zwei Prüfkonzentrationen, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit zu untersuchen. Sollten die Ergebnisse des minimierten Versuchs, der mit zwei Prüfkonzentrationen durchgeführt wurde, zeigen, dass der BCF nicht konzentrationsabhängig ist (*d. h.* weniger als 20% abweicht), kann eine einzige Prüfkonzentration für die vollständige Prüfung als ausreichend angesehen werden (falls diese durchgeführt wird).
- Es kann davon ausgegangen werden, dass Modelle für Bioakkumulationsprozesse wie die von Arnot et al. (35) vorgeschlagenen Prozesse die Planung der Dauer der Aufnahme- und Ausscheidungsphase erleichtern (siehe auch Anlage 5).

Berechnungen

92. Grund für diesen Ansatz ist die Tatsache, dass der Biokonzentrationsfaktor bei einer vollständigen Prüfung entweder als Biokonzentrationsfaktor bei stationärem Zustand (BCF_{SS}) - durch Berechnung des Quotienten der Prüfstoffkonzentration im Fischgewebe und der Prüfstoffkonzentration im Wasser - oder als kinetischer Biokonzentrationsfaktor (BCF_K) durch Berechnung des Quotienten der Aufnahmekonstanten k_1 und der Ausscheidungskonstanten k_2 - bestimmt werden kann. Der BCF_K ist auch dann gültig, wenn während der Aufnahme keine Stoffkonzentration im stationären Zustand erreicht wird, vorausgesetzt, die Aufnahme und Ausscheidung folgen in etwa Prozessen der Kinetik erster Ordnung. Als absolutes Minimum werden zwei Datenpunkte für die Schätzung der Aufnahme- und der Ausscheidungskonstanten benötigt - einer am Ende der Aufnahme- (*d. h.* zu Beginn der Ausscheidungsphase) und einer am Ende (oder nach einem signifikanten Teil) der Ausscheidungsphase. Der zwischengeschaltete Probenahmezeitpunkt wird zur Kontrolle der Aufnahme- und Ausscheidungskinetik empfohlen⁽¹⁾. Für Berechnungen siehe Anlagen 5 und 6.

Auswertung der Ergebnisse

93. Zur Bewertung der Gültigkeit und Aussagekraft des Versuchs sollte überprüft werden, ob die Dauer der Ausscheidungsphase eine Halbwertszeit überschreitet. Ebenso sollte der BCF_{K_m} (aus einem minimierten Versuch abgeleiteter kinetischer BCF) mit dem minimierten BCF_{SS} -Wert (BCF_{SS} , der am Ende der Aufnahme- in der Annahme berechnet wird, dass ein Fließgewicht erreicht wird. Dies kann nur angenommen werden, da die Probenahmezeitpunkte für einen entsprechenden Nachweis nicht ausreichen) verglichen werden. Ist $BCF_{K_m} <$ als der minimierte BCF_{SS} , sollte letzterer als Wert der Wahl herangezogen werden. Ist der BCF_{K_m} kleiner als 70 % des minimierten BCF_{SS} , sind die Ergebnisse unschlüssig, und es sollte ein vollständiger Versuch durchgeführt werden.
94. Wenn der minimierte Versuch einen BCF_{K_m} im Bereich eines aus regulatorischer Sicht bedenklichen Wertes ergibt, sollte eine vollständige Prüfung durchgeführt werden. Ist das Ergebnis weit von einem aus regulatorischer Sicht bedenklichen Wert entfernt (liegt es erheblich darüber oder darunter), so ist eine vollständige Prüfung u. U. nicht erforderlich oder es kann eine vollständige Prüfung mit nur einer Konzentration durchgeführt werden, sofern dies in maßgeblichen Rahmenvorschriften vorgeschrieben ist.
95. Wird nach einem minimierten Versuch mit nur einer Konzentration eine vollständige Prüfung als notwendig erachtet, kann diese mit einer zweiten Konzentration durchgeführt

⁽¹⁾ Werden nur zwei Datenpunkte gemessen, können die Konfidenzgrenzen für den BCF_{K_m} nach Bootstrapping-Methoden geschätzt werden. Wenn Datenzwischenpunkte verfügbar sind, können die Konfidenzgrenzen für den BCF_{K_m} wie bei der vollständigen Prüfung berechnet werden.

werden. Bei übereinstimmenden Ergebnissen kann auf eine weitere vollständige Prüfung mit einer weiteren Konzentration verzichtet werden, da die Biokonzentration des Stoffs voraussichtlich nicht konzentrationsabhängig ist. Wurde der minimierte Versuch mit zwei Konzentrationen durchgeführt und erweisen sich die Ergebnisse nicht als konzentrationsabhängig, so braucht die vollständige Prüfung mit nur einer Konzentration durchgeführt zu werden (siehe Nummer 87).

Prüfbericht

96. Der Prüfbericht für den minimierten Test sollte alle für die vollständige Prüfung erforderlichen Informationen enthalten (siehe Nummer 81), außer solche, die nicht generiert werden können (wie eine Kurve zur Anzeige der Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustands und des Biokonzentrationsfaktors bei stationärem Zustand; für letzteren sollte stattdessen der minimierte BCF_{ss} angegeben werden). Zudem sollten die Gründe für die Anwendung des minimierten Tests und der resultierende BCF_{Km} angegeben werden.

C.13 - III: Bioakkumulationstest an Fischen - Exposition über das Futter

EINLEITUNG

97. Die in diesem Abschnitt beschriebene Methode betrifft Stoffe, für die die Methode mit aquatischer Exposition nicht geeignet ist (beispielsweise weil keine stabilen, messbaren Wasserkonzentrationen aufrechterhalten werden können oder weil innerhalb einer Expositionsdauer von 60 Tagen keine angemessene Körperbelastung erreicht werden kann; siehe vorangegangenen Abschnitt zur Methode mit aquatischer Exposition). Es ist zu beachten, dass der Endpunkt bei diesem Test ein futterbezogener Biomagnifikationsfaktor (BMF) und kein Biokonzentrationsfaktor (BCF)⁽¹⁾ ist.
98. Im Mai 2001 wurde auf der SETAC Europe-Konferenz in Madrid eine neue Methode zur Prüfung der Bioakkumulation von Stoffen mit sehr geringer Wasserlöslichkeit vorgestellt (36). Diese Arbeiten basierten auf verschiedenen Bioakkumulationsstudien (über die in der Fachliteratur berichtet wurde), bei denen eine Dosierungsmethode mit dotiertem Futter (z. B. (37)) zum Einsatz kam. Anfang 2004 wurde der Entwurf eines Protokolls (38) zur Messung des Bioakkumulationspotenzials von Stoffen mit geringer Wasserlöslichkeit, bei denen der Standard-Bioakkumulationstest mit aquatischer Exposition nicht durchführbar

⁽¹⁾ Vgl. Anlage 1 für Definitionen und Einheiten.

war, vorgelegt, zusammen mit einem unterstützenden Beweisdokument (39) einer PBT-Arbeitsgruppe der EU. Als weiterer Rechtsfertigungsgrund für die Anwendung der Methode wurde angegeben, dass die potenzielle Umweltbelastung durch diese schwer wasserlöslichen Stoffe (d. h. Stoffe mit $\log K_{ow} > 5$) weitestgehend über das Futter erfolgt (vgl. (40) (41) (42) (43) (44)). Aus diesem Grund wird in einigen veröffentlichten Chemikalienverordnungen auf Prüfungen mit Exposition über das Futter verwiesen⁽¹⁾. Es ist jedoch zu beachten, dass bei der hier beschriebenen Methode die Exposition über die wässrige Phase sorgfältig vermieden wird und ein BMF-Wert aus dieser Prüfmethode somit nicht direkt mit einem BMF-Wert aus einer Feldstudie (bei der die aquatische Exposition und die Exposition über das Futter miteinander kombiniert werden kann) verglichen werden kann.

99. Dieser Abschnitt der vorliegenden Prüfmethode basiert auf diesem Protokoll (38) und entspricht einer neuen Methode, die in der vorherigen Fassung der Prüfmethode C.13 nicht enthalten war. Bei dieser alternativen Prüfung kann die Exposition über das Futter unter kontrollierten Laborbedingungen direkt untersucht werden.
100. Um zu entscheiden, wann die Prüfung mit Exposition über das Futter der Prüfung mit aquatischer Exposition vorzuziehen ist, sollten potenzielle Prüfer die Nummern 1 bis 14 dieser Prüfmethode konsultieren, die Informationen über verschiedene stoffliche Kriterien enthalten, die vor der Durchführung einer Prüfung berücksichtigt werden sollten.
101. Für radioaktiv markierte Stoffe gelten ähnliche Überlegungen wie bei der Methode mit aquatischer Exposition (siehe Nummern 6 und 65).
102. Die futterbasierte Methode gestattet es, mehrere Stoffe in einem einzigen Versuch zu prüfen, so lange bestimmte Kriterien erfüllt sind; siehe Nummer 112. Der Einfachheit halber wird hier eine Prüfung beschrieben, bei der nur ein Prüfstoff zum Einsatz kommt.
103. Der futterbasierte Test ähnelt der Methode mit aquatischer Exposition in vielerlei Hinsicht - bis auf den Expositionspfad. Daher überschneiden sich viele Aspekte der hier beschriebenen Methode mit der im vorstehende beschriebenen Methode mit aquatischer Exposition. Es wird, soweit möglich, auf die entsprechenden Punkte im vorangegangenen Abschnitt verwiesen, jedoch ist im Interesse der Leserfreundlichkeit und des guten Verständnisses ein gewisses Maß an Duplizierung unvermeidbar.

⁽¹⁾ Zum Zwecke der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) (ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1) wurde dieser Aspekt in den Leitlinien zu Informationsanforderungen und Stoffsicherheitsbeurteilung, Kapitel R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1 und Abbildung R7.10-2, S geregelt.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

104. Durchfluss- oder semistatische Prüfbedingungen sind möglich (siehe Nummer 4); Durchflussbedingungen werden allerdings empfohlen, um die potenzielle aquatische Exposition gegenüber dem Prüfstoff infolge einer Desorption aus dotiertem Futter oder Exkrementen zu begrenzen. Die Prüfung umfasst zwei Phasen: Aufnahme (mit Prüfstoff dotiertes Futter) und Ausscheidung (reines, unbehandeltes Futter) (siehe Nummer 16). In der Aufnahmephase wird eine „Prüfgruppe“ Fische täglich mit einem handelsüblichen prüfstoffdotierten Futter bekannter Zusammensetzung gefüttert. Die Fische sollten im Idealfall das gesamte angebotene Futter aufnehmen (siehe Nummer 141) und erhalten anschließend während der Ausscheidungsphase unbehandeltes handelsübliches Futter. Wie bei der Methode mit aquatischer Exposition können ggf. mehrere Prüfgruppen unterschiedlich stark dotierten Prüfstoffkonzentrationen ausgesetzt werden, jedoch reicht für die meisten stark hydrophoben organischen Prüfstoffe eine Prüfgruppe aus (siehe Nummern 49 und 107). Unter semistatischen Bedingungen sollten die Fische am Ende der Aufnahmephase in ein neues Medium und/oder eine neue Prüfkammer umgesetzt werden (falls das in der Aufnahmephase verwendete Medium und/oder die verwendete Apparatur durch Auslaufen mit dem Prüfstoff kontaminiert sind). Die Prüfstoffkonzentrationen in den Fischen werden in beiden Prüfungsphasen gemessen. Zusätzlich zu der mit dotiertem Futter gefütterten Fischgruppe (Prüfgruppe) wird eine Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen gehalten und auf identische Weise gefüttert, außer dass die aus handelsüblichem Fischfutter bestehende Nahrung nicht mit dem Prüfstoff dotiert wurde. Diese Kontrollgruppe ermöglicht die Quantifizierung der Hintergrundwerte des Prüfstoffs in nicht exponierten Fischen und dient als Vergleich für behandlungsbedingte Schadwirkungen, die bei der bzw. den Prüfgruppe(n) festgestellt wurden¹. Sie ermöglicht zudem den Vergleich der Wachstumskonstanten zwischen den Gruppen und somit die Kontrolle, ob ähnliche Mengen des angebotenen Futters aufgenommen wurden (potenzielle Unterschiede in der Schmackhaftigkeit zwischen Futterarten sollten bei der Begründung unterschiedlicher Wachstumskonstanten ebenfalls berücksichtigt werden; siehe Nummer 138). Es ist wichtig, dass die Prüf- und die Kontrollgruppe während der Aufnahme- und Ausscheidungsphase gleichwertiges Futter erhalten.
105. Nach den Erfahrungen der Prüfmethodeentwickler reicht eine Aufnahmephase von 7-14 Tagen im Allgemeinen aus (38) (39). Auf diese Weise lassen sich die Kosten für die Durchführung der Prüfung begrenzen und für die meisten Stoffen gleichzeitig eine

¹ Bei den meisten Prüfstoffen sollten sich im Idealfall keine Nachweise im Kontrollwasser finden. Hintergrundkonzentrationen sollten nur bei natürlich vorkommenden Stoffen (z. B. bestimmten Metallen) und in der Umwelt allgemein vorkommenden Stoffen relevant sein.

ausreichende Exposition sicherstellen. In bestimmten Fällen kann die Aufnahmephase jedoch verlängert werden (siehe Nummer 127). Während dieser Phase erreicht die Prüfstoffkonzentration in den Fischen möglicherweise keinen stationären Zustand, weshalb die Datenauswertung und Ergebnisse dieser Methode in der Regel auf einer kinetischen Analyse von Geweberückständen beruhen. (Hinweis: Wie schon bei der Prüfung mit aquatischer Exposition kann die bis zum Erreichen des stationären Zustands erforderliche Zeit anhand von Gleichungen geschätzt werden – siehe Anlage 5). Die Ausscheidungsphase beginnt, wenn die Fische erstmals nicht dotiertes Futter erhalten, und dauert bis zu 28 Tage oder bis der Prüfstoff nicht mehr im ganzen Fisch quantifizierbar ist, je nachdem, welcher Zeitpunkt zuerst eintritt. Die Ausscheidungsphase kann je nach gemessenen Prüfstoffkonzentrationen und Fischgröße verkürzt oder über 28 Tage hinaus verlängert werden.

106. Diese Methode ermöglicht es, für den Prüfstoff im Fisch die stoffspezifische Halbwertszeit ($t_{1/2}$, anhand der Ausscheidungskonstanten k_2), die Assimilationseffizienz (Absorption im Darm, α), den kinetischen futterbezogenen Biomagnifikationsfaktor (BMF_K), den wachstumskorrigierten kinetischen futterbezogenen Biomagnifikationsfaktor (BMF_{Kg}) und den lipidkorrigierten⁽¹⁾ kinetischen futterbezogenen Biomagnifikationsfaktor (BMF_{KL}) (und/oder den wachstums- und lipidkorrigierten kinetischen futterbezogenen Biomagnifikationsfaktor, BMF_{KgL}) zu bestimmen. Wie bei der Methode mit aquatischer Exposition führt die Zunahme der Fischmasse während der Prüfung zu einer Verdünnung der Prüfstoffkonzentration in wachsenden Fischen, was dazu führt, dass der (kinetische) BMF zu niedrig geschätzt wird, wenn er nicht um das Wachstum korrigiert wird (siehe Nummern 162 und 163). Wird ferner davon ausgegangen, dass in der Aufnahmephase ein stationärer Zustand erreicht wurde, kann ein indikativer BMF bei stationärem Zustand berechnet werden. Es gibt Ansätze, die die Schätzung eines kinetischen Biokonzentrationsfaktors (BCF_K) auf Basis der in der futterbasierten Studie gewonnenen Daten ermöglichen (z. B. (44) (45) (46) (47) (48)). Pros und Kontras solcher Ansätze werden in Anlage 8 erörtert.
107. Der Test wurde primär für unpolare organische Stoffe mit geringer Löslichkeit entwickelt, die in Fischen ungefähr der Aufnahme- und Ausscheidungskinetik erster Ordnung folgen. Wird ein Stoff geprüft, der nicht der Aufnahme- und Ausscheidungskinetik erster Ordnung folgt, sollten komplexere Modelle verwendet (siehe

⁽¹⁾ Da der BMF als Verhältnis der Konzentration eines Stoffs in einem Organismus zur Konzentration des Stoffs in der Nahrung des Organismus bei stationärem Zustand definiert ist, werden Lipide durch Korrektur um den Lipidgehalt des Organismus und des Futters berücksichtigt und folglich - exakter - als „Korrektur“ beschrieben. Dieser Ansatz unterscheidet sich von der Festlegung eines „standardisierten“ Lipidgehalts für den Organismus, wie dies beim Biokonzentrationsstest mit aquatischer Exposition der Fall ist.

Referenzdokumente in Anlage 5) und Biostatistiker und/oder Pharmakokinetiker konsultiert werden.

108. Der BMF wird normalerweise bestimmt, indem ganze Fische einer Prüfstoffanalyse unterzogen werden (basierend auf dem Nassgewicht). Sofern für die Ziele der Studie relevant, können Proben bestimmter Gewebe (z. B. Muskel, Leber) entnommen werden, wenn der Fisch in genießbare und ungenießbare Teile zerlegt wird (siehe Nummer 21). Zudem kann der Magen-Darm-Trakt entfernt und separat analysiert werden, um dessen Anteil an den Prüfstoffkonzentrationen für Probenahmepunkte am Ende der Aufnahme- und kurz vor Beginn der Ausscheidungsphase oder im Rahmen eines Massenbilanzansatzes zu bestimmen.
109. Der Lipidgehalt der Ganzfischproben sollte gemessen werden, damit Konzentrationen zur Berücksichtigung des Lipidgehalts sowohl des Futters als auch der Fische korrigiert werden können (siehe Nummern 56 und 57 und Anlage 7).
110. Zur Berechnung des während der Prüfung eventuell eingetretenen Wachstums sollte das Gewicht der beprobten Fische gemessen und protokolliert und der für die einzelnen Fische bestimmten Stoffkonzentration zugeordnet werden (z. B. über einen individuellen Kenncode für jeden beprobten Fisch). Die Gesamtlänge der einzelnen Fische sollte, soweit möglich, ebenfalls gemessen werden⁽¹⁾. Gewichtsdaten sind auch für die Schätzung des BCF anhand der Ausscheidungsdaten aus dem futterbasierten Test unerlässlich.

ANGABEN ZUM PRÜFSTOFF

111. Es sollten die unter den Nummern 3 und 22 genannten Prüfstoffangaben vorliegen. Eine Methode zur Analyse der Prüfstoffkonzentrationen in Wasser ist in der Regel nicht notwendig; ausreichend empfindliche Methoden für die Messung der Konzentrationen in Fischfutter und Fischgewebe sind hingegen erforderlich.
112. Mit der Methode lassen sich im Rahmen eines einzigen Tests mehrere Stoffe untersuchen. Allerdings sollten die Prüfstoffe so kompatibel sein, dass sie nicht interagieren oder ihre chemische Identität bei der Dotierung ins Fischfutter verändern. Bezweckt wird, dass die Messergebnisse für jeden der zusammen getesteten Prüfstoffe nicht allzu stark von den Werten abweichen, die sich ergeben hätten, wenn jeder Prüfstoff einzeln getestet worden wäre. Mit Voranalysen sollten belegen, dass jeder Stoff in einer mehrfach dotierten Futter- und Fischgewebeprobe i) mit hoher Rate (z. B. > 85% des

⁽¹⁾ Die Gesamtlänge sollte auch während der Prüfung protokolliert werden, denn sie ist ein guter Indikator für das Auftreten einer Schädigung.

Nennwerts) und ii) der für die Prüfung erforderlichen Empfindlichkeit wiedergefunden werden kann. Die Gesamtdosis zusammen geprüfter Stoffe sollte unter der kombinierten Konzentration liegen, die toxische Wirkungen hervorrufen könnte (siehe Nummer 51). Zudem sollten bei der Versuchsplanung mögliche Schädwirkungen in den Fischen und potenzielle interaktive Wirkungen (z. B. metabolische Wirkungen), die mit der gleichzeitigen Prüfung mehrerer Stoffe assoziiert werden, berücksichtigt werden. Die simultane Prüfung ionisierbarer Stoffe sollte vermieden werden. Unter Expositionsgesichtspunkten ist die Methode auch für komplexe Gemische (siehe Nummer 13, obwohl die gleichen analytischen Grenzen gelten wie für jede andere Methode) geeignet.

GÜLTIGKEIT DER PRÜFUNG

113. Eine Prüfung wird als gültig betrachtet, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind (siehe Nummer 24):

- Die Wassertemperatur schwankt bei den Behandlungs- oder Kontrollgruppen um weniger als ± 2 °C.
- Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff fällt nicht unter einen Luftsättigungswert von 60 %.
- Die Prüfstoffkonzentration im Fischfutter vor und am Ende der Aufnahmeperiode liegt im Bereich von ± 20 % (basierend auf mindestens drei Probenahmen zu jedem der beiden Zeitpunkte).
- Bei Voranalysen des dotierten Futters sollte ein hohes Maß an Homogenität des Stoffs im Futter nachgewiesen werden; mindestens drei Stoffkonzentrationen, die in den zu Prüfungsbeginn entnommenen Proben gemessen wurden, sollten um nicht mehr als ± 15 % vom Mittelwert abweichen.
- Prüfstoffkonzentrationen werden nicht nachgewiesen oder sind im Vergleich zu behandelten Proben nur in typischen Spurenwerten in nicht dotiertem Futter oder in Kontrollfischgewebe vorhanden.
- Mortalität oder andere Schädwirkungen/Krankheiten bei Fischen der Kontroll- und der Prüfgruppe liegen am Ende der Prüfung unter 10 %; wird der Test aus einem bestimmten Grund verlängert, sollten Schädwirkungen bei beiden Fischgruppen weniger als 5 % pro Monat betragen und insgesamt 30 % nicht überschreiten. Signifikante Unterschiede im durchschnittlichen Wachstum bei beprobten Fischen der Prüf- und Kontrollgruppen könnten auf eine toxische Wirkung des Prüfstoffs hindeuten.

REFERENZSTOFFE

114. Führt ein Labor die Prüfung zum ersten Mal durch oder wurden wesentliche Änderungen vorgenommen (beispielsweise Änderungen des Fischstammes oder der Bezugsquelle, wesentliche Änderung der Fischgröße, des Fischfutters oder des Dotierungsverfahrens usw.), sollte unter Verwendung eines Referenzstoffs eine technische Eignungsprüfung durchgeführt werden. Der Referenzstoff wird hauptsächlich verwendet, um nachzuweisen, ob das Verfahren der Futterdotierung maximale Homogenität und die Bioverfügbarkeit des Prüfstoffs gewährleistet. Ein Referenzstoff, der beispielsweise bereits bei unpolaren hydrophoben Stoffen verwendet wurde, ist Hexachlorbenzol (HCB), doch sollten aufgrund der Gefahrstoffeigenschaft von HCB auch andere Stoffe, für die zuverlässige Daten zu Aufnahme und Biomagnifikation vorliegen, erwogen werden¹. Falls HCB verwendet wird, sollte der Prüfbericht, wie auch für Prüfstoffe, alle wesentliche Referenzstoffangaben wie Name, Reinheit, CAS-Nummer, Struktur, Toxizitätsdaten (falls verfügbar) enthalten (siehe Nummern 3 und 22).

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

115. Materialien und Apparatur sollten, wie bereits für die Methode mit aquatischer Exposition beschrieben, verwendet werden (siehe Nummer 26). Es sollte ein Durchflussverfahren oder ein statisches Erneuerungsverfahren angewandt werden, das Verdünnungswasser in ausreichender Menge zu den Prüfbehälter führt. Die Durchflussraten sollten protokolliert werden.

Wasser

116. Das Prüfwasser sollte, wie bereits für die Methode mit aquatischer Exposition beschrieben, verwendet werden (siehe Nummern 27-29). Das Prüfmedium sollte wie beschrieben charakterisiert werden und während der Prüfung von gleichbleibender Qualität sein. Der natürliche Partikelgehalt und der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) sollten vor Testbeginn möglichst gering sein (≤ 5 mg/l Partikel; ≤ 2 mg/l TOC). Der TOC muss lediglich vor der Prüfung als Teil der Charakterisierung des Prüfwassers gemessen werden (siehe Nummer 53).

Futter

⁽¹⁾ HCB ist in den Anhängen A und C des Stockholmer Übereinkommens sowie in den Anhängen I und III der Verordnung (EG) Nr. 850/2004 über persistente organische Schadstoffe (ABl. L 158 vom 30.4.2004, S. 7) aufgeführt.

117. Empfohlen wird handelsübliches Fischfutter (schwimmfähiges und/oder langsam absinkendes pelletiertes Futter), das zumindest in Bezug auf den Protein- und Fettgehalt charakterisiert ist. Das Futter sollte eine einheitliche Pelletgröße aufweisen, um die Exposition über das Futter zu optimieren, d. h. die Fische nehmen auf diese Weise mehr Futter auf und fressen nicht nur die größeren Stücke. Die Pellets sollten zu Prüfungsbeginn eine der Größe der Fische angepasste Größe aufweisen (z. B. sind Pelletdurchmesser von ungefähr 0,6-0,85 mm für Fische einer Gesamtlänge von 3 bis 7 cm und Pelletdurchmesser von ungefähr 0,85-1,2 mm für Fische einer Gesamtlänge von 6 bis 12 cm geeignet). Die Pelletgröße kann zu Beginn der Ausscheidungsphase dem Fischwachstum angepasst werden. Ein Beispiel einer geeigneten Zusammensetzung (handelsüblichen) Fischfutters findet sich in Anlage 7. Bei der Entwicklung dieser Methode wurde routinemäßig Prüffutter mit einem Gesamtlipidgehalt von 15 bis 20 % (w/w) verwendet. Fischfutter mit einer derart hohen Lipidkonzentration ist in bestimmten Regionen möglicherweise nicht erhältlich. In diesem Fall könnten die Versuche mit einer niedrigeren Lipidkonzentration im Futter durchgeführt werden und die Fütterungsrate könnte (auf Basis von Vorversuchen) angepasst werden, um die Fische gesund zu halten. Der Gesamtlipidgehalt des Futters der Prüf- und Kontrollgruppe muss vor Beginn der Prüfung und am Ende der Aufnahmephase gemessen und protokolliert werden. Der Prüfbericht sollte Herstellerangaben zu Nährstoffgehalt, Feuchtigkeit, Faser- und Aschegehalt und, falls möglich, Mineralien und Pestizidrückstände (z. B. „standardmäßige“ prioritäre Schadstoffe) des handelsüblichen Futters enthalten.
118. Bei der Dotierung des Futters mit dem Prüfstoff sollte sichergestellt werden, dass das Prüffutter homogen ist. Die Prüfstoffkonzentration im Futter der Prüfgruppe sollte unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit des Analyseverfahrens, der Toxizität des Prüfstoffs (NOEC, soweit bekannt) und der relevanten physikalisch-chemischen Daten gewählt werden. Der Referenzstoff, falls verwendet, sollte vorbehaltlich der Analyseempfindlichkeit möglichst in einer Konzentration von ungefähr 10 % der Prüfstoffkonzentration (in jedem Fall so niedrig wie möglich sein) einbezogen werden (Beispiel: bei Hexachlorbenzol wurde eine Konzentration im Futter von 1-100 µg/g als akzeptabel erachtet; siehe (47) für weitere Informationen über Assimilationseffizienzen von HCB).
119. Das Fischfutter kann je nach physikalischen Eigenschaften und Löslichkeit auf verschiedene Weise mit dem Prüfstoff dotiert werden (für nähere Informationen über Dotierungsmethoden siehe Anlage 7):
- Ist der Stoff in Triglyceriden löslich und stabil, sollte er vor seiner Beimischung zum Fischfutter in einer geringen Menge Fischöl oder pflanzlichem Speiseöl gelöst werden. In diesem Fall sollte unter Berücksichtigung des natürlichen Lipidgehalts des dotierten Futters die Herstellung von Rationen mit zu hohem Lipidgehalt unbedingt vermieden werden, indem die bekannte Mindestmenge Öl beigemischt wird, die erforderlich ist, um eine gute Verteilung und Homogenität des Prüfstoffs im Futter zu erreichen, oder

- das Futter sollte mithilfe eines geeigneten organischen Lösungsmittels dotiert werden, soweit dies die Homogenität und Bioverfügbarkeit nicht beeinträchtigt (im Futter können sich infolge der Verdunstung des Lösungsmittels (Mikro-)Kristalle des Prüfstoffs bilden, und es lässt sich nicht einfach nachweisen, dass dies nicht der Fall ist; siehe (49)), oder
- nicht zähflüssige Flüssigkeiten sollten dem Fischfutter direkt beigegeben, jedoch gut vermischt werden, um Homogenität und gute Assimilation zu gewährleisten. Gutes Mischen dürfte die Homogenität des dotierten Futters gewährleisten.

In bestimmten Fällen, z. B. bei weniger hydrophoben Prüfstoffen, die mit größerer Wahrscheinlichkeit aus dem Futter desorbieren, müssen vorbereitete Fischpellets möglicherweise mit einer geringen Menge Maiskeim- oder Fischöl beschichtet werden (siehe Nummer 142). In diesen Fällen sollten das Kontrollfutter gleich behandelt und das fertig zubereitete Futter für die Lipidmessung verwendet werden.

120. Die Ergebnisse für den Referenzstoff, falls verwendet, sollten mit den Daten einer in der Fachliteratur beschriebenen, unter ähnlichen Bedingungen und mit einer vergleichbarer Fütterungsrate durchgeführten Studie komparabel sein (siehe Nummer 45), und die spezifischen Parameter des Referenzstoffs sollten die relevanten Kriterien unter Nummer 113 (Unterpunkte 3, 4 und 5) erfüllen.
121. Wenn als Vehikel für den Prüfstoff Öl oder ein Trägerlösungsmittel verwendet wird, sollte eine entsprechende Menge desselben Vehikels (Prüfstoff ausgenommen) mit dem Kontrollfutter vermischt werden, um ein dem dotierten Futter gleichwertiges Futter zu erhalten. Dabei ist wichtig, dass die Prüf- und Kontrollgruppen während der Aufnahme- und der Ausscheidungsphase gleichwertiges Futter erhalten.
122. Das dotierte Futter sollte unter Bedingungen gelagert werden, die die Stabilität des Prüfstoffs innerhalb der Futtermischung garantieren (z. B. durch Kühlung); diese Bedingungen sind anzugeben.

Auswahl der Fischarten

123. Es können die gleichen Fischarten verwendet werden, die auch für die aquatische Exposition in Frage kommen (siehe Nummer 32 und Anlage 3). Vor Veröffentlichung dieser Prüfmethode wurden für futterbasierte Bioakkumulationsstudien mit organischen Stoffen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Dickkopflritzen (*Pimephales promelas*) verwendet. Die Prüfspezies sollten ein Fressverhalten aufweisen, das den raschen Verzehr der verabreichten Futtermenge gewährleistet, um Faktoren, die die Konzentration des Prüfstoffs im Futter beeinflussen könnten (wie Auslaugen ins Wasser und Möglichkeit aquatischer Exposition), auf ein Mindestmaß zu begrenzen. Es sollten Fische innerhalb des empfohlenen Größen-/Gewichtsbereichs (siehe Anlage 3) verwendet werden. Sie sollten nicht so klein sein, dass einzelne Fische nur mit Schwierigkeiten analysiert werden können. Bei Spezies, die in einer Lebensphase schnellen Wachstums untersucht werden, kann die Datenauswertung

schwierig sein, und hohe Wachstumsraten können die Berechnung der Assimilationseffizienz beeinflussen⁽¹⁾.

Haltung der Fische

124. Die Kriterien bezüglich Akklimatisierung, Mortalität und Erkrankung vor Prüfungsbeginn sind dieselben wie für die Methode mit aquatischer Exposition (*siehe* Nummern 33-35).

DURCHFÜHRUNG DES TESTS

Vorversuch und Dosisfindungstest

125. Ein analytischer Vorversuch ist notwendig, um Wiederfindung des Prüfstoffs im dotierten Fischfutter/Fischgewebe nachzuweisen. Ein Dosisfindungstest zur Entscheidung über die geeignete Prüfstoffkonzentration im Futter ist nicht immer erforderlich. Um nachzuweisen, dass keine Schädwirkungen auftreten, und die Schmackhaftigkeit des dotierten Futters, die Empfindlichkeit der Methode für die Analyse des Fischgewebes und des Futters und die Wahl der geeigneten Fütterungsrate sowie die Zeitabstände für die Probenahmen während der Ausscheidungsphase usw. zu bewerten, können Fütterungsvorversuche durchgeführt werden, sind aber nicht erforderlich. Eine Vorstudie kann hilfreich sein, um abzuschätzen, wie viele Fische während der Ausscheidungsphase beprobt werden müssen. Dies kann zu einer erheblichen Verringerung der Zahl der Versuchsfische führen, insbesondere bei Prüfstoffen, die metabolisierungsanfällig sind.

Expositionsbedingungen

Dauer der Aufnahmephase

126. Eine Aufnahmephase von 7-14 Tagen, in der eine Gruppe Fische täglich das Kontrollfutter und eine zweite Gruppe Fische täglich eine auf die Prüfspezies und Versuchsbedingungen zugeschnittene Ration Prüffutter (z. B. 1-2 % des Körpergewichts (Nassgewicht) bei Regenbogenforellen) erhält, reicht in der Regel aus. Die Fütterungsrate sollte so gewählt werden, dass schnelles Wachstum und eine starke Zunahme des Lipidgehalts vermieden werden. Die Aufnahmephase kann erforderlichenfalls auf Basis praktischer Erfahrungen aus früheren Versuchen oder von Informationen über das

⁽¹⁾ Bei schnellem Wachstum während der Aufnahmephase sinkt die eigentliche Fütterungsrate gegenüber der zu Expositionsbeginn festgelegten Rate.

Aufnahme-/Ausscheidungsverhalten des Prüfstoffs (oder eines analogen Stoffs) bei Fischen verlängert werden. Der Prüfungsbeginn ist definiert als der Zeitpunkt der ersten Fütterung mit dotiertem Futter. Ein Versuchstag reicht vom Zeitpunkt der Fütterung bis kurz vor den Zeitpunkt der nächsten Fütterung (z. B. eine Stunde). Somit beginnt der erste Versuchstag (Aufnahmephase) zum Zeitpunkt der ersten Fütterung mit dotiertem Futter und endet kurz vor der zweiten Fütterung mit dotiertem Futter. In der Praxis endet die Aufnahmephase kurz vor (z. B. eine Stunde vor) der ersten Fütterung mit undotiertem Prüfstoff, da die Fische das dotierte Futter in den dazwischenliegenden 24 Stunden weiterhin verdauen und den Prüfstoff absorbieren. Im Interesse der Analysemethode muss sichergestellt werden, dass eine ausreichend hohe (nicht toxische) Körperbelastung durch den Prüfstoff erreicht wird, damit in der Ausscheidungsphase zumindest ein Rückgang um eine Zehnerpotenz gemessen werden kann. In besonderen Fällen kann eine (auf bis zu 28 Tage) verlängerte Aufnahmephase mit weiteren Probenahmen beschlossen werden, um Informationen über die Aufnahmekinetik zu erhalten. Während der Aufnahme erreicht die Konzentration möglicherweise keinen stationären Zustand. Wie auch bei der Prüfung mit aquatischer Exposition können Gleichungen zur Schätzung der Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustands (als Anhaltspunkt für die wahrscheinlich erforderliche Zeit bis zum Erreichen nennenswerter Konzentrationen in den Fischen) verwendet werden (siehe Anlage 5).

127. In bestimmten Fällen ist möglicherweise bekannt, dass die Aufnahme des Prüfstoffs durch die Fische über einen Zeitraum von 7-14 Tagen aufgrund der unzulänglichen Empfindlichkeit der Methode oder einer schlechten Assimilationseffizienz nicht ausreichen wird, um mit der verwendeten Futterkonzentration eine Prüfstoffkonzentration in den Fischen zu erreichen, die hoch genug ist, um während der Ausscheidung zumindest einen Rückgang um eine Zehnerpotenz messen zu können. In solchen Fällen kann es von Vorteil sein, die anfängliche Fütterungsphase über 14 Tage hinaus zu verlängern, oder es sollte eine höhere Prüfstoffkonzentration im Futter in Betracht gezogen werden, insbesondere bei stark metabolisierenden Stoffen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Körperbelastung während der Aufnahme unterhalb der (geschätzten) chronischen Konzentration bleibt, bei der keine statistisch signifikante Wirkung beobachtet wird (NOEC) (siehe Nummer 138).

Dauer der Ausscheidungsphase

128. Die Ausscheidung dauert in der Regel bis zu 28 Tage und beginnt, wenn die Fische der Prüfgruppe im Anschluss an die Aufnahmephase reines, unbehandeltes Futter Nahrung erhalten. Die Ausscheidung beginnt mit der ersten Fütterung mit „undotiertem“ Futter und nicht etwa direkt nach der letzten Fütterung mit „dotiertem“ Futter, da die Fische das Futter in den dazwischenliegenden 24 Stunden weiterhin verdauen und den Prüfstoff absorbieren, wie unter Nummer Punkt 126 beschrieben. Somit wird die erste Probe in der Ausscheidungsphase kurz vor der zweiten Fütterung mit undotiertem Futter entnommen.

Mit dieser Ausscheidungsphase sollen Stoffe mit einer potenziellen Halbwertszeit von bis zu 14 Tagen erfasst werden, was mit der Halbwertszeit bioakkumulativer Stoffe übereinstimmt⁽¹⁾, sodass 28 Versuchstage zwei Halbwertszeiten solcher Stoffe umfassen. Bei sehr stark bioakkumulierenden Stoffen kann es von Vorteil sein, die Ausscheidungsphase zu verlängern (falls aufgrund von Vorversuchen indiziert).

129. Wird ein Stoff so langsam ausgeschieden, dass in der Ausscheidungsphase keine exakte Halbwertszeit bestimmt werden kann, reichen die erhaltenen Informationen möglicherweise dennoch aus, um ein hohes Bioakkumulationsniveau anzuzeigen und Bewertungen vorzunehmen. Wird ein Stoff hingegen so schnell ausgeschieden, dass eine zuverlässige Konzentration zum Zeitpunkt Null (Konzentration am Ende der Aufnahme/Anfang der Ausscheidung, $C_{0,d}$) und k_2 nicht abgeleitet werden können, kann eine konservative Schätzung von k_2 vorgenommen werden (*siehe* Anlage 7).
130. Wenn frühere Analysen der (z. B. nach 7 oder 14 Tagen) beprobten Fische zeigen, dass der Stoff vor Ablauf der vollen 28 Tage unterhalb des Quantifizierungsniveaus ausgeschieden wurde, können nachfolgende Probenahmen eingestellt und die Prüfung beendet werden.
131. In bestimmten Fällen lässt sich am Ende der Aufnahmephase (oder bei der zweiten Ausscheidungsprobe) keine messbare Aufnahme des Prüfstoﬀs feststellen. Wenn nachgewiesen werden kann, dass i) die Validitätskriterien gemäß Nummer 113 erfüllt sind und ii) eine mangelnde Aufnahme nicht auf andere Prüfungsmängel (z. B. zu kurze Aufnahmephase, mangelhafte Futterdotierung mit entsprechend schlechter Bioverfügbarkeit, mangelnde Empfindlichkeit des Analyseverfahrens, kein Futterverzehr durch die Fische usw.) zurückzuführen ist, kann die Prüfung beendet werden, ohne dass sie mit einer längeren Aufnahmephase erneut durchgeführt werden muss. Hat sich im Vorversuch gezeigt, dass dies der Fall sein kann, kann im Rahmen eines Massenbilanzansatzes soweit möglich eine Analyse der Exkremate auf unverdauten Prüfstoﬀ ratsam sein.

Anzahl Versuchsfische

132. Ähnlich wie bei der Prüfung mit aquatischer Exposition sollten Fische von vergleichbarem Gewicht und vergleichbarer Länge gewählt werden, wobei der kleinste Fisch nicht weniger als zwei Drittel des Gewichts des größten Fisches haben sollte (*siehe* Nummern 40-42).

⁽¹⁾ Bei einem Versuch mit aquatischer Exposition entspräche eine Halbwertszeit von 14 Tagen einem BCF von etwa 10 000 L/kg bei Fischen von 1 g mit einer entsprechenden Aufnahme rate von etwa 500 L/kg/Tag (nach der Gleichung nach Sijm *et al* (46)).

133. Die Gesamtzahl der für die Studie verwendeten Fische sollte sich nach dem Probenahmezeitplan richten (mindestens eine Probenahme am Ende der Aufnahme phase und 4-6 Probenahmen während der Ausscheidungsphase, je nach Dauer der Phasen), wobei die Empfindlichkeit des Analyseverfahrens, die am Ende Aufnahme phase wahrscheinliche Konzentration (auf Basis früherer Erkenntnisse) und die Ausscheidungsphase (falls frühere Erkenntnisse eine Schätzung zulassen) berücksichtigt werden sollten. Bei jeder Probenahme sollten 5-10 Fische entnommen werden, wobei die Wachstumsparameter (Gewicht und Gesamtlänge) vor der chemischen Analyse oder der Lipidanalyse gemessen werden.
134. Aufgrund der unvermeidbaren Größen-, Wachstums- und physiologischen Unterschiede zwischen den Fischen und der wahrscheinlich unterschiedlichen Futtermenge, die jeder Fisch verzehrt, sollten zu jedem Probenahmezeitpunkt mindestens 5 Fische aus der Prüfgruppe und 5 Fische aus der Kontrollgruppe entnommen werden, um die Durchschnittskonzentration und ihre Variabilität bestimmen zu können. Die Variabilität der Fischparameter trägt wahrscheinlich stärker zur unkontrollierten Gesamtvariabilität der Prüfung bei als die inhärente Variabilität der angewandten Analysemethoden und rechtfertigt somit in bestimmten Fällen die Verwendung von bis zu 10 Fischen je Probenahme. Sind die Hintergrundkonzentrationen des Prüfstoffs in den Kontrollfischen zu Beginn der Ausscheidung jedoch nicht messbar, reicht eine chemische Analyse von 2-3 Kontrollfischen bei der letzten Probenahme nur dann aus, wenn die übrigen Kontrollfische bei jeder Probenahme weiterhin zur Erfassung von Gewicht und Gesamtlänge beprobt werden (um zwar so, dass zur Wachstumsbestimmung jedes Mal dieselbe Anzahl Fische aus der Prüf- und der Kontrollgruppe untersucht wird). Die Fische sollten gelagert und einzeln gewogen (selbst wenn es sich als notwendig erweisen sollte, die Probenergebnisse anschließend zu kombinieren) und ihre Gesamtlänge sollte gemessen werden.
135. So erfordert ein Standardtest mit einer beispielsweise 28 Tage dauernden Ausscheidungsphase und fünf Ausscheidungsproben insgesamt 59-120 Fische aus der Prüf- und 50-110 Fische aus der Kontrollgruppe, wobei davon ausgegangen wird, dass es das Analyseverfahren für den Stoff erlaubt, den Lipidgehalt am selben Fisch zu analysieren. Können die Lipidanalyse und die chemische Analyse nicht am selben Fisch durchgeführt werden und ist die Verwendung von Kontrollfischen ausschließlich zum Zwecke der Lipidanalyse nicht möglich (siehe Nummer 56), wären weitere 15 Fische erforderlich (drei aus der Stammpopulation zu Prüfungsbeginn, jeweils drei aus der Kontroll- und der Prüfgruppe zu Beginn der Ausscheidung und jeweils drei aus der Kontroll- und Prüfgruppe am Ende des Versuchs). Ein Beispiel eines Probenahmeplans mit den entsprechenden Fischzahlen findet sich in Anlage 4.

Besatz

136. Es empfiehlt sich ein ebenso großes Wasser/Fisch-Verhältnis wie bei der Methode mit aquatischer Exposition (siehe Nummern 43 und 44). Obwohl sich die Fisch/Wasser-Besatzraten nicht auf die Expositionskonzentrationen in diesem Versuch auswirken, wird eine Besatzrate von 0,1-1,0 g Fisch (Nassgewicht) pro Liter Wasser und Tag empfohlen, um angemessene Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff aufrechtzuerhalten und die Stressbelastung der Prüforganismen möglichst gering zu halten.

Prüffutter und Fütterung

137. Während der Akklimatisierungsphase sollten die Fische, wie oben beschrieben, geeignetes Futter erhalten (Nummer 117). Wird der Test unter Durchflussbedingungen durchgeführt, sollte der Durchfluss während der Fütterung unterbrochen werden.

138. Während der Prüfung sollte die Prüfgruppe nur das vorstehend beschriebene Futter erhalten (Nummern 116-121). Neben stoffspezifischen Faktoren, der Empfindlichkeit der Analyseverfahren, der erwarteten Prüfstoffkonzentration im Futter unter bestimmten Umweltbedingungen und der chronischen Toxizitätswerte/Körperbelastung sollte zur Festlegung der Zielkonzentration des Prüfstoffs im Futter auch dessen Schmelzhaftigkeit berücksichtigt werden (damit die Fische das Futter nicht ablehnen). Die nominelle Dotierungskonzentration sollte im Bericht festgehalten werden. Erfahrungsgemäß sind Dotierungskonzentrationen von 1-1000 µg/g für Versuche mit Prüfstoffen geeignet, die keinen spezifischen toxischen Mechanismus aufweisen. Bei Stoffen, die über einen unspezifischen Mechanismus wirken, sollten die Geweberückstände 5 µmol/g Lipid nicht überschreiten, da Rückstände über diesem Niveau wahrscheinlich chronische Wirkungen hervorrufen (19) (48) (50)⁽¹⁾. Bei anderen Stoffen sollte darauf geachtet werden, dass aufgrund der akkumulierten Exposition keine Schmelzwirkungen auftreten (siehe Nummer 127). Dies gilt insbesondere, wenn mehrere Stoffe gleichzeitig geprüft werden (siehe Nummer 112).

139. Das Fischfutter kann auf drei verschiedene Arten mit der geeigneten Menge Prüfstoff dotiert werden (siehe Nummer 119 und Anlage 7). Die Methoden und Verfahren für die Futterdotierung sollten im Bericht festgehalten werden. Die Kontrollfische erhalten unbehandeltes Futter, das eine gleichwertige Menge an undotiertem Öl enthält, soweit Öl als Vehikel in der Aufnahmephase im dotierten Futter verwendet wird, oder das mit „reinem“ Lösungsmittel behandelt wurde, wenn ein Lösungsmittel bei der Zubereitung des Futters für die Prüfgruppe als Vehikel verwendet wurde. Die Prüfstoffkonzentration im

⁽¹⁾ Da die tatsächlichen internen Konzentrationen erst nach abgeschlossener Prüfung bestimmt werden können, muss die erwartete interne Konzentration im Futter geschätzt werden (z. B. auf der Grundlage des erwarteten BMF und der Konzentration im Futter; siehe Gleichung A5.8 in Anlage 5).

behandelten und unbehandelten Futter sollte vor Beginn und am Ende der Aufnahme phase mindestens drei Mal analysiert werden. Nach der Exposition gegenüber dem behandelten Futter (Aufnahme phase) erhalten die Fische (beide Gruppen) unbehandeltes Futter (Ausscheidung phase).

140. Die Fische erhalten eine bestimmte Ration (je nach Spezies; z. B. ca. 1-2 % des Nasskörpergewichts pro Tag im Falle der Regenbogenforelle). Die Fütterungsrate sollte gewährleisten, dass schnelles Wachstum und eine starke Zunahme des Lipidgehalts vermieden werden. Die exakte Fütterungsrate, die während des Versuchs festgelegt wurde, sollte protokolliert werden. Die anfängliche Fütterung sollte auf der Grundlage der Gewichtsmessungen der Stammpopulation unmittelbar vor Prüfungsbeginn erfolgen. Die Futtermenge sollte je nach Nassgewicht der bei jeder Probenahme entnommenen Fische angepasst werden, um das Wachstum während des Versuchs zu berücksichtigen. Die Gewichte und Längen der Fische in den Prüf- und Kontrollbehältern können auf Basis der Gewichte und Gesamtlängen der für die einzelnen Probenahmen verwendeten Fische geschätzt werden; die übrigen Fische in den Prüf- oder Kontrollbehältern sollten nicht gewogen oder gemessen werden. Es ist wichtig, dass die vorgegebene Fütterungsrate während des gesamten Versuchs aufrechterhalten wird.
141. Die Fütterung sollte beobachtet werden, um sicherzustellen, dass die Fische das gesamte verabreichte Futter verzehren und die für die Berechnungen verwendeten Ingestionsraten korrekt sind. Bei der Festlegung einer Fütterungsrate, die gewährleistet, dass bei einer einmal täglichen Fütterung das gesamte Futter aufgenommen wird, sollten Fütterungsvorversuche oder vorherige Erfahrungswerte berücksichtigt werden. Wird systematisch ein Teils des Futters nicht verzehrt, empfiehlt es sich, die Dosis mit einer zweiten Fütterung über den Versuchstag zu verteilen (d. h. eine Tagesration - zwei Fütterungen). Falls erforderlich, sollte die zweite Fütterung zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgen und zeitlich so festgelegt werden, dass vor der Beprobung der Fische so viel Zeit wie möglich vergeht (diese zweite Fütterung erfolgt beispielsweise in der ersten Hälfte eines Versuchstags).
142. Obwohl die Fische das Futter in der Regel rasch aufnehmen, muss unbedingt sichergestellt werden, dass der Prüfstoff an das Futter adsorbiert bleibt. Es sollte vermieden werden, dass sich der Prüfstoff aus dem Futter ins Wasser verteilt und von den Fischen zusätzlich zum Futter auch in wässrigen Konzentrationen aufgenommen werden. Dies wird erreicht, indem nicht verzehrtes Futter (und Exkremete) innerhalb einer Stunde, jedoch vorzugsweise innerhalb von 30 Minuten, nach der Fütterung aus den Prüf- und Kontrollbehältern entfernt wird (werden). Zudem kann ein System angewendet werden,

bei dem das Wasser kontinuierlich über einen Aktivkohlefilter gereinigt wird und „gelöste“ Verunreinigungen absorbiert werden. Durchflusssysteme können dazu beitragen, Partikel und gelöste Stoffe schnell wegzuspülen⁽¹⁾. In bestimmten Fällen lässt sich das Problem durch Modifikation des Verfahrens für die Zubereitung des dotierten Futters abschwächen (siehe Nummer 119).

Licht und Temperatur

143. Wie bei der Methode mit aquatischer Exposition (siehe Nummer 48) wird eine Photoperiode von 12-16 Stunden und eine für die verwendete Prüfspezies geeignete Temperatur (± 2 °C) empfohlen (siehe Anlage 3). Art und Merkmale der Beleuchtung sollten bekannt sein und dokumentiert werden.

Kontrollen

144. Es sollte eine Kontrollgruppe aus Fischen gebildet werden, die dieselbe Futterration wie die Prüfgruppe erhalten, jedoch ohne Prüfstoff. Wurde in der Prüfgruppe Öl oder ein Lösungsmittel als Vehikel für die Futterdotierung verwendet, sollte das Futter der Kontrollgruppe auf exakt dieselbe Weise, jedoch ohne Prüfstoff, verabreicht werden, d. h. Prüf- und Kontrollgruppe sollten dasselbe Futter erhalten (siehe Nummer 121 und 139).

Häufigkeit der Wasserqualitätsmessungen

145. Die Bedingungen, die für die Methode mit aquatischer Exposition beschrieben wurden, gelten analog, außer dass der TOC nur vor der Prüfung als Teil der Prüfwassercharakterisierung gemessen werden muss (siehe Nummer 53).

Beprobung von und Analyse von Fischen und Futter

Analyse der Futterproben

146. Proben des Futters der Prüf- und Kontrollgruppe sollten zumindest vor Beginn und am Ende der Aufnahme phase und zumindest dreifach auf Prüfstoff und Lipidgehalt untersucht werden. Die Analysemethoden sowie die Verfahren, mit denen die Homogenität des Futters gewährleistet werden soll, sind im Bericht anzugeben.

⁽¹⁾ Das Vorhandensein von Prüfstoff im Prüfmedium infolge der Exkretion durch die Fische oder des Auslaugens aus dem Futter lässt sich u. U. nicht vollständig vermeiden. Folglich besteht eine Möglichkeit darin, die Stoffkonzentration im Wasser am Ende der Aufnahme phase zu messen, insbesondere wenn ein semistatisches Systems angewendet wird, um festzustellen, ob es zu einer aquatischen Exposition gekommen ist.

147. Die Proben sollten nach der vorgegebenen und validierten Methode auf Prüfstoff analysiert werden. Es sollte ein Vorversuch durchgeführt werden, um für die vorgesehene Probenmatrix die Quantifizierungsgrenze, die Wiederfindungsrate (in Prozent), etwaige Interferenzen und die Variabilität der Analyse zu bestimmen. Wird radioaktiv markiertes Material geprüft, sollten dieselben Aspekte geprüft werden wie bei der Methode mit aquatischer Exposition, wobei die Futteranalyse die Wasseranalyse ersetzt (siehe Nummer 65).

Analyse der Fischproben

148. Für jede Beprobung werden 5-10 einzelne Fische aus den Prüf- und Kontrollgruppen entnommen (in bestimmten Fällen kann die Zahl der Kontrollfische verringert werden; siehe Nummer 134).
149. Die Proben sollten an jedem Versuchstag zum selben Zeitpunkt (je nach Fütterungstermin) entnommen werden, und zwar möglichst zu einem Zeitpunkt, der die Wahrscheinlichkeit, dass Futter während der Aufnahme- und zu Beginn der Ausscheidungsphase im Darm verbleibt, auf ein Minimum begrenzt, um unerwünschte Verfälschungen der Gesamtprüfstoffkonzentrationen zu vermeiden (d. h. zu beprobende Fische sollten gegen Ende eines Versuchstags entnommen werden, wobei zu beachten ist, dass ein Versuchstag mit dem Zeitpunkt der Fütterung beginnt und mit dem Zeitpunkt der nächsten Fütterung, also ungefähr 24 Stunden später, endet. Die Ausscheidung beginnt mit der ersten Fütterung des undotierten Futters; siehe Nummer 128). Die erste Probenahme in der Ausscheidungsphase (kurz vor der zweiten Fütterung mit undotiertem Futter) ist wichtig, denn sie dient der Extrapolation der Konzentration zum Zeitpunkt Null, einen Tag vor dieser Messung ($C_{0,d}$, die Konzentration in den Fischen am Ende der Aufnahme/Anfang der Ausscheidung). Es besteht auch die Möglichkeit, den Magen-Darm-Trakt der Fische zu entfernen und am Ende der Aufnahme sowie an den Tagen 1 und 3 der Ausscheidung separat zu analysieren.
150. Bei jeder Probenahme sollten aus beiden Prüfbehältern Fische entnommen und auf dieselbe Weise behandelt werden wie bei der Methode mit aquatischer Exposition beschrieben (siehe Nummer 61-63).
151. Die Prüfstoffkonzentrationen im Ganzfisch (Nassgewicht) werden mindestens am Ende der Aufnahme- und während der Ausscheidungsphase und zwar sowohl für die Kontroll- als auch für die Prüfgruppe gemessen. Für die Ausscheidungsphase werden 4-6 Probenahmen empfohlen (z. B. an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28). Optional kann eine zusätzliche Probenahme nach 1-3 Tagen der Aufnahme hinzugezogen werden, um die Assimilationseffizienz ab der linearen Aufnahme- und Ausscheidungsphase zu schätzen, wenn die Fische sich noch am Anfang der Expositionsperiode befinden. Zwei Abweichungen vom Versuchsplan sind möglich: i) wenn die Aufnahme- und Ausscheidungsphase zur Untersuchung der Aufnahmekinetik verlängert wird, sind für diese Phase weitere Probenahmezeitpunkte vorzusehen, um mehr

Fische untersuchen zu können (siehe Nummer 126); ii) wenn am Ende der Aufnahme phase keine Aufnahme messbar ist, muss der Versuch beendet werden (siehe Nummer 131). Jeder entnommene Fisch sollte gewogen (und seine Gesamtlänge gemessen) werden, um die Wachstumskonstanten bestimmen zu können. Die Stoffkonzentrationen in bestimmten Fischgeweben (genießbare und ungenießbare Teile) können auch am Ende der Aufnahme phase und zu ausgewählten Zeitpunkten während der Ausscheidung gemessen werden. Wird radioaktiv markiertes Material geprüft, sollten ähnliche Aspekte wie bei der Methode mit aquatischer Exposition geprüft werden, wobei die Futteranalyse die Wasseranalyse ersetzt (siehe Nummer 65).

152. Bei regelmäßiger Verwendung eines Referenzstoffs (siehe Nummer 25) sollten die Konzentrationen in der Prüfgruppe möglichst am Ende der Aufnahme und zu allen für den Prüfstoff festgelegten Ausscheidungszeitpunkten gemessen werden (Ganzfische); in der Kontrollgruppe müssen die Konzentrationen nur am Ende der Aufnahme analysiert werden (Ganzfische). Unter bestimmten Umständen (beispielsweise, wenn die Analyseverfahren für die Prüf- und die Referenzsubstanz inkompatibel sind, sodass mehr Fische notwendig werden, um den Probenahmeplan einzuhalten) kann ein anderer Ansatz gewählt werden, um die Zahl der zusätzlichen Fische auf ein Mindestmaß zu begrenzen. Die Referenzstoffkonzentrationen werden während der Ausscheidung nur an den Tagen 1 und 3 sowie zwei weiteren Probenahmezeitpunkten gemessen, die so gewählt werden, dass die Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,d}$) und k_2 für den Referenzstoff zuverlässig geschätzt werden kann.

153. Soweit möglich, sollte der Lipidgehalt der einzelnen Fische bei jeder Probenahme oder zumindest am Anfang und Ende der Aufnahme phase und am Ende der Ausscheidungsphase bestimmt werden. (siehe Nummern 56 und 67). Je nach Analyse methode (siehe Nummer 67 und Anlage 4) ist es u. U. möglich, zur Bestimmung des Lipidgehalts und der Prüfstoffkonzentration dieselben Fische zu verwenden, was sich im Interesse der Begrenzung der Versuchstierzahl empfiehlt. Sollte dies jedoch nicht möglich sein, kann derselbe Ansatz wie bei der Methode mit aquatischer Exposition gewählt werden (siehe Nummer 56 für alternative Möglichkeiten der Lipidgehaltmessung). Die für die Quantifizierung des Lipidgehalts angewandte Methode sollte im Bericht dokumentiert werden.

Qualität der Analyse methode

154. Es sollten Versuchskontrollen durchgeführt werden, um die Spezifität, Genauigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit des stoffspezifischen Analyseverfahrens sowie die Wiederfindung des Prüfstoffs im Futter und in den Fischen zu gewährleisten.

Messung des Fischwachstums

155. Zu Beginn der Prüfung muss eine Probe Fische aus der Stammpopulation gewogen (und ihre Gesamtlänge gemessen) werden. Diese Fische sollten kurz vor der ersten Fütterung mit dotiertem Futter (z. B. 1 Stunde davor) entnommen und dem Versuchstag 0 zugeordnet werden. Die Zahl der Fische in dieser Probe sollte der für die Probenahmen während der Prüfung vorgesehenen Zahl zumindest entsprechen. Dabei kann sich um dieselben Fische handeln, die vor Beginn der Aufnahme phase für die Lipidanalyse verwendet wurden (siehe Nummer 153). Zu jedem Probenahmezeitpunkt werden die Fische zunächst gewogen und längenvermessen. Für jeden Fisch sollten Messgewicht (und Messlänge) der analysierten Stoffkonzentration (und ggf. dem Lipidgehalt) zugeordnet werden, z. B. anhand eines individuellen Kenncodes für jeden untersuchten Fisch. Anhand der Messwerte für diese Fischproben können Gewicht (und Länge) der in den Prüf- und Kontrollbehältern verbleibenden Fische geschätzt werden.

Evaluierung des Versuchs

156. Todesfälle sollten täglich protokolliert werden. Es sollte außerdem auf Schädwirkungen wie Verhaltensanomalien oder Pigmentierung geachtet werden; entsprechende Vorkommnisse sind aufzuzeichnen. Fische gelten als tot, wenn keine Atmung mehr stattfindet und es bei leichter mechanischer Stimulierung zu keiner Reaktion kommt. Tote oder eindeutig moribunde Fische sollten entfernt werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

157. Die Prüfungsergebnisse werden verwendet, um anhand des Gesamtnassgewichts der Fische die Ausscheidungskonstante (k_2) abzuleiten. Die Wachstumskonstante, k_g , wird anhand der mittleren Zunahme des Fischgewichts berechnet und ggf. zur Bestimmung der wachstumskorrigierten Ausscheidungskonstante, k_{2g} , verwendet. Zudem sollten die Assimilationseffizienz (α ; Absorption aus dem Darm), der kinetische Biomagnifikationsfaktor (BMF_K) (ggf. der wachstumskorrigierte Biomagnifikationsfaktor, BMF_{Kg}), der lipidkorrigierte Wert (BMF_{KL} oder BMF_{KgL} , falls um die Verdünnung durch Wachstum korrigiert) und die Fütterungsrate dokumentiert werden. Soweit die Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustands in der Aufnahme phase geschätzt werden kann (z. B. 95 % des stationären Zustands oder $t_{95} = 3,0/k_2$), kann auch der BMF im stationären Zustand (BMF_{SS}) einbezogen werden (siehe Nummern 105 und 106 und Anlage 5), falls der t_{95} -Wert darauf hindeutet, dass ein stationären Zustand erreicht zu sein scheint. Auf diesen BMF_{SS} sollte dieselbe Lipidgehaltkorrektur angewendet werden wie auf den kinetisch abgeleiteten BMF (BMF_K), um einen lipidkorrigierten Wert, BMF_{SSL} , zu erhalten (dabei ist zu beachten, dass ein anerkanntes Verfahren für die Korrektur eines BMF im stationären Zustand um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum existiert). Formeln

und Berechnungsbeispiele finden sich in Anlage 7. Es existieren verschiedene Ansätze zur Schätzung eines kinetischen Biokonzentrationsfaktors (BCF_K) anhand von Daten aus der futterbasierten Studie. Sie sind Gegenstand von Anlage 8.

Daten zu Fischgewicht und Fischlänge

158. Die Nassgewichte und Längen der einzelnen Fische werden, aufgeschlüsselt nach Prüf- und Kontrollgruppen, für alle Probenahmezeitpunkte in der Aufnahmephase (Stammpopulation zu Beginn der Aufnahme; Kontroll- und Prüfgruppe am Ende der Aufnahme) und ggf. in der Anfangsphase (z. B. Tag 1-3 der Aufnahme) und in der Ausscheidungsphase (z. B. Tage 1, 2, 4, 7, 14, 28 für die Kontroll- und die Prüfgruppe) tabellarisch dargestellt. Das Gewicht ist der bevorzugte Wachstumsparameter für die Korrektur um den Effekt der Verdünnung durch das Wachstum. Angaben zu der (den) angewandten Methode(n) für die Korrektur der Daten um den Effekt der Verdünnung durch das Wachstum siehe Nummer 162 und 163 sowie Anlage 5.

Daten zur Prüfstoffkonzentration in den Fischen

159. Die Messungen der Prüfstoffrückstände in einzelnen Fischen (oder gepoolten Fischproben, falls Messungen an einzelnen Fischen nicht möglich sind), werden, ausgedrückt als Nassgewichtskonzentration (w/w), für die Prüf- und die Kontrollfische, aufgeschlüsselt nach Probenahmezeitpunkten, tabellarisch dargestellt. Wurde die Lipidanalyse bei jedem entnommenen Fisch durchgeführt, können einzelne lipidkorrigierte Konzentrationen als Lipidkonzentration (w/w Lipid) abgeleitet und tabellarisch dargestellt werden.

- Die Messungen der Prüfstoffrückstände in einzelnen Fischen (oder gepoolten Fischproben, falls Messungen an einzelnen Fischen nicht möglich sind, siehe Nummer 66) für die Ausscheidungsphase werden in ihre natürlichen Logarithmen umgewandelt und gegen die Zeit (Tag) aufgetragen. Werden bei einer visuellen Überprüfung der graphischen Darstellung „Ausreißer“ festgestellt, kann ein statistisch gültiger Ausreißertest angewendet werden, um falsche Datenpunkte zu entfernen; die Gründe dafür sind zu dokumentieren.
- Für $\ln(\text{Konzentration})$ gegen Ausscheidung (Tag) wird eine lineare Korrelation der kleinsten Quadrate berechnet. Steigung und Achsenabschnitt der Geraden werden als Gesamtausscheidungskonstante (k_2) und natürlicher Logarithmus der abgeleiteten Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,d}$) angegeben (für nähere Informationen siehe Anlagen 5 und 7). Sollte dies nicht möglich sein, da die Konzentrationen unter die Quantifizierungsgrenze für die zweite Ausscheidungsprobe fallen, kann eine konservative Schätzung von k_2 durchgeführt werden (siehe Anlage 7).
- Die Abweichungen in der Steigung und im Achsenabschnitt der Geraden werden nach statistischen Standardverfahren berechnet, und die 90 %- (oder 95 %)-Konfidenzintervalle um diese Ergebnisse werden bewertet und dargestellt.
- Ferner wird die gemessene mittlere Konzentration in den Fischen am letzten Tag der Aufnahme (gemessene Konzentration zum Zeitpunkt Null, $C_{0,m}$) berechnet und mit dem

abgeleiteten Wert $C_{0,d}$ verglichen. Ist der abgeleitete Wert geringer als der gemessene Wert, kann die Differenz auf das Vorhandensein von unverdaulichem dotiertem Futter im Darm hindeuten. Ist der abgeleitete Wert wesentlich höher als der gemessene Wert, kann dies ein Anzeichen dafür sein, dass der abgeleitete Wert aus der linearen Regression der Ausscheidungsdaten falsch ist und neu bewertet werden muss (siehe Anlage 7).

Ausscheidungsrate und Biomagnifikationsfaktor

160. Zur Errechnung des Biomagnifikationsfaktors aus den Daten sollte zunächst die Assimilationseffizienz (Absorption des Prüfstoffs im Darm, α) bestimmt werden. Hierzu sollte die Gleichung A7.1 in Anlage 7 verwendet werden, wobei die abgeleitete Konzentration in den Fischen zum Zeitpunkt Null der Ausscheidungsphase ($C_{0,d}$), die (Gesamt-)Ausscheidungskonstante (k_2), die Konzentration im Futter (C_{Futter}), die Futteringestionskonstante (I) und die Dauer der Aufnahmezeit (t) bekannt sein müssen. Die Steigung und der Achsenabschnitt der linearen Beziehung zwischen dem natürlichen Logarithmus der Konzentration und dem Ausscheidungszeitpunkt werden als Gesamtausscheidungskonstante ($k_2 = \text{Steigung}$) und Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,d} = e^{\text{Achsenabschnitt}}$) wie oben angegeben. Die abgeleiteten Werte sollten auf biologische Plausibilität geprüft werden (z. B. Assimilationseffizienz ist als Bruchteil nicht größer als 1). (I) wird durch Division der Masse des Futters durch die Masse des täglich gefütterten Fisches (wird dieser im Wert von 2 % seines Körpergewichts gefüttert, entspricht (I) 0,02) berechnet. Jedoch sollte die für die Berechnung verwendete Fütterungsrate um das Fischwachstum korrigiert werden (eventuell unter Verwendung der bekannten Wachstumskonstanten zur Schätzung des Fischgewichts zu jedem Zeitpunkt während der Aufnahmezeit; siehe Anlage 7). In Fällen, in denen k_2 und $C_{0,d}$ nicht berechnet werden können, weil bei der zweiten Ausscheidungsprobe die Konzentrationen beispielsweise unter die Nachweisgrenze gefallen sind, kann eine konservative Schätzung von k_2 und eines „oberen“ BMF_k vorgenommen werden (siehe Anlage 7).
161. Nachdem die Assimilationseffizienz (α) bestimmt wurde, kann der Biomagnifikationsfaktor durch Multiplikation von α mit der Ingestionskonstante (I) und Division durch die (Gesamt-)Ausscheidungskonstante (k_2) berechnet werden. Der wachstumskorrigierte Biomagnifikationsfaktor wird auf dieselbe Weise berechnet, jedoch anhand der wachstumskorrigierten Ausscheidungskonstanten (k_{2g} ; siehe Nummern 162 und 163). Eine alternative Schätzung der Assimilationseffizienz kann abgeleitet werden, wenn die Gewebeanalyse an den in der frühen, linearen Phase der Aufnahmezeit entnommenen Fischen durchgeführt wurde; siehe Nummer 151 und Anlage 7. Dieser Wert entspricht einer unabhängigen Schätzung der Assimilationseffizienz bei einem im Wesentlichen nicht exponierten Organismus (d. h. Fische ganz am Anfang der Aufnahmezeit). Die anhand der Ausscheidungsdaten geschätzte Assimilationseffizienz wird in der Regel zur Berechnung des BMF herangezogen.

Lipidkorrektur und Korrektur um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum

162. Das Fischwachstum während der Ausscheidungsphase kann die gemessenen Stoffkonzentrationen in den Fischen verringern, wodurch die Gesamtausscheidungskonstante (k_2) größer ist als sie es bei den Ausscheidungsprozessen (z. B. Atmung, Metabolismus, Egestion) alleine wäre (siehe Nummer 72). Der Lipidgehalt der Prüffische (der eng mit der Bioakkumulation hydrophober Stoffe in Zusammenhang steht) und der Lipidgehalt des Futters können in der Praxis derart variieren, sodass eine Korrektur notwendig ist, um sinnvolle Biomagnifikationsfaktoren zu erhalten. Der Biomagnifikationsfaktor sollte um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum (wie der kinetische BCF bei der Methode mit aquatischer Exposition) und den Lipidgehalt des Futters im Vergleich zu dem des Fisches (Lipidkorrekturfaktor) korrigiert werden. Gleichungen und Beispiele für diese Berechnungen finden sich in Anlage 5 bzw. Anlage 7.
163. Zwecks Korrektur um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum sollte die wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante (k_{2g}) berechnet werden (siehe Anlage 5 für Gleichungen). Diese wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante (k_{2g}) wird verwendet, um den wachstumskorrigierten Biomagnifikationsfaktor zu berechnen (siehe Nummer 73). In bestimmten Fällen ist dieser Ansatz nicht möglich. Ein alternativer Ansatz, der die Notwendigkeit einer Korrektur um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum umgeht, besteht in der Verwendung von Daten über die Prüfstoffmasse pro Fisch (Ganzfische) bei der Ausscheidung anstelle der üblichen Daten zur Prüfstoffmasse pro Fischmasseneinheit (Konzentration). Diese Berechnung ist einfach, da Prüfungen nach dieser Methode die protokollierten Gewebekonzentrationen mit dem Gewicht der einzelnen Tiere korreliert werden. Dieses einfache Verfahren wird in Anlage 5 beschrieben. Es ist zu beachten, dass k_2 auch bei Anwendung dieses alternativen Ansatzes geschätzt und angegeben werden sollte.
164. Zwecks Korrektur um den Lipidgehalt des Futters und der Fische, wenn die Lipidanalyse nicht bei allen beprobten Fischen durchgeführt wurde, werden die mittleren Lipidfraktionen (w/w) in den Fischen und im Futter berechnet⁽¹⁾. Der Lipidkorrekturfaktor (L_c) wird sodann durch Division der mittleren Lipidfraktion der Fische durch die mittlere Lipidfraktion des Futters berechnet. Der Biomagnifikationsfaktor (ggf. wachstumskorrigiert) wird durch den Lipidkorrekturfaktor dividiert, um den lipidkorrigierten Biomagnifikationsfaktor zu berechnen.

⁽¹⁾ Dieser Ansatz gilt speziell für die futterbasierte Studie und unterscheidet sich von dem bei der Methode mit aquatischer Exposition verwendeten Ansatz. Aus diesem Grunde wurde anstelle von „Standardisierung“ der Begriff „Korrektur“ verwendet, um Irreführung zu vermeiden – siehe auch Fußnote in Nummer (106).

165. Wurde die Stoff- und Lipidanalyse an jedem Probenahmezeitpunkt an ein und denselben Fischen durchgeführt, können die lipidkorrigierten Gewebedaten für einzelne Fische zur direkten Berechnung eines lipidkorrigierten BMF verwendet werden (siehe (37)). Die Kurve der Daten über die lipidkorrigierte Konzentration ergibt $C_{0,d}$ (bezogen auf die Lipide) und k_2 . Anschließend kann die mathematische Analyse nach den Gleichungen in Anlage 7 erfolgen, die Assimilationseffizienz (α) wird jedoch anhand der lipidstandardisierten Futteringestionskonstante (I_{Lipid}) und der auf die Lipide bezogenen Konzentration im Futter ($C_{\text{Futter-Lipid}}$) berechnet. Die lipidkorrigierten Parameter werden sodann in ähnlicher Weise verwendet, um den BMF zu berechnen (es ist zu beachten, dass die Korrektur um die Wachstumskonstante auch auf die Lipidfraktion und nicht auf das Nassgewicht der Fische angewendet werden sollte, um den lipid- und wachstumskorrigierten BMF_{kgL} zu berechnen).

Interpretation der Ergebnisse

166. Das durchschnittliche Wachstum sollte bei Prüf- und Kontrollgruppen grundsätzlich nicht allzu stark variieren, um toxische Wirkungen auszuschließen. Die Wachstumskonstanten oder die Wachstumskurven der beiden Gruppen sollten nach einem geeigneten Verfahren miteinander verglichen werden⁽¹⁾.

Prüfbericht

167. Nach Abschluss des Versuchs ist ein Schlussbericht mit Angaben zu *Prüfstoff*, *Prüfspezies* und *Prüfbedingungen* (siehe Nummer 81 und Methode mit aquatischer Exposition) zu erstellen. Daneben sind folgende Angaben erforderlich:

Prüfstoff:

- Angaben zur Stabilität des Prüfstoffs im zubereiteten Futter;

Prüfbedingungen:

- Nominale Stoffkonzentration im Futter, Dotierungsverfahren, Menge des für die Futterdotierung verwendeten (Lipid-)Vehikels, Messungen der Prüfstoffkonzentration im dotierten Futter bei jeder Analyse (mindestens dreifach vor Versuchsbeginn sowie am Ende der Aufnahme) und Mittelwerte;

⁽¹⁾ Es kann ein *t*-Test auf Wachstumskonstanten durchgeführt werden, um festzustellen, ob es zwischen Kontroll- und Prüfgruppen Wachstumsunterschiede gibt, oder ein *F*-Test im Falle einer Varianzanalyse. Ein *F*-Test oder *Likelihood-Ratio*-Test kann die Auswahl des geeigneten Wachstumsmodells vereinfachen (OECD Monograph 54 (32)).

- Art und Qualität des Trägeröls oder -lösungsmittels (Güte, Lieferant usw.), das für die Futterdotierung verwendet wird;
- verwendete Futterart (Sofortanalyse⁽¹⁾, Güte oder Qualität, Lieferant usw.), Fütterungsrate in der Aufnahmephase, verabreichte Futtermenge und Häufigkeit der Fütterung (einschließlich Anpassungen je nach Gewicht der beprobten Fische);
- Zeitpunkt, an dem die Fische für die Stoffanalyse entnommen und getötet wurden (z. B. 1 Stunde vor der Fütterung am folgenden Tag), nach Probenahmezeitpunkten;

Ergebnisse:

- Ergebnisse aus etwaigen Vorversuchen;
- Beschreibung etwaiger festgestellter Schadwirkungen;
- vollständige Beschreibung aller angewandten chemischen Analyseverfahren, einschließlich Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen, Variabilität und Wiederfindung;
- gemessene Lipidkonzentrationen im Futter (dotiertes Futter und Kontrollfutter), individuelle Werte, Mittelwerte und Standardabweichungen;
- tabellarisch dargestellte Daten zu Fischgewicht (und Fischlänge), bezogen auf einzelne Fische, sowohl für die Kontroll- als auch die Prüfgruppe (z. B. mittels individuellen Kenncodes für die einzelnen Fische) und Berechnungen, abgeleitete Wachstumskonstante(n) und 95 %-Konfidenzintervalle;
- tabellarisch dargestellte Daten zur Prüfstoffkonzentration in den Fischen, mittlere gemessene Konzentration am Ende der Aufnahme ($C_{0,m}$) und abgeleitete (Gesamt-)Ausscheidungskonstante (k_2) und Konzentration in den Fischen zu Beginn der Ausscheidungsphase ($C_{0,d}$), zusammen mit den Varianzen in diesen Werten (Steigung und Achsenabschnitt);
- tabellarisch dargestellte Daten zum Lipidgehalt der Fische (ggf. aufgelistet nach spezifischen Stoffkonzentrationen), Mittelwerte für Prüfgruppe und Kontrolle zu Prüfungsbeginn, am Ende der Aufnahmephase und am Ende der Ausscheidungsphase;
- Kurven (einschließlich aller gemessenen Daten), aus denen Folgendes hervorgeht (falls zutreffend, können die Konzentrationen bezogen auf den Ganzkörper des Tiers oder bestimmte Gewebe ausgedrückt werden):

⁽¹⁾ Verfahren zu Analyse des Protein-, Lipid-, Rohfaser- und Aschegehalts von Futtermitteln; diese Angaben sind normalerweise beim Futtermittellieferant erhältlich.

- Wachstum (d. h. Fischgewicht (und Fischlänge) im Verhältnis zur Zeit) oder durch natürliches Logarithmieren transformiertes Gewicht im Verhältnis zur Zeit;
 - Ausscheidung des Prüfstoffs durch die Fische; und
 - durch natürliches Logarithmieren transformierte Konzentration ($\ln(\text{Konzentration})$) im Verhältnis zur Dauer der Ausscheidungsphase (einschließlich der abgeleiteten Ausscheidungskonstanten k_2 , durch natürliches Logarithmieren abgeleitete Konzentration in den Fischen zu Beginn der Ausscheidungsphase, $C_{0,d}$);
- werden bei einer visuellen Überprüfung einer graphischen Darstellung „Ausreißer“ festgestellt, kann ein statistisch gültiger Ausreißertest durchgeführt werden, um falsche Datenpunkte zu entfernen; die Gründe hierfür sind zu dokumentieren;
 - berechnete wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante und wachstumskorrigierte Halbwertszeit;
 - berechnete Assimilationseffizienz (a);
 - Brutto-BMF (futterbezogen), lipid- und wachstumskorrigierter kinetischer BMF (brutto und lipidkorrigiert auf Basis des Ganzfischnassgewichts), ggf. gewebespezifischer BMF;
 - etwaige Angaben zu Metaboliten radioaktiv markierter Prüfstoffe und deren Akkumulation;
 - etwaige Besonderheiten im Zusammenhang mit der Prüfung, etwaige Abweichungen von den genannten Verfahren sowie etwaige anderen relevanten Informationen;
 - Übersichtstabelle relevanter Mess- und Berechnungsdaten (wie nachfolgend):

Stoffspezifische Ausscheidungskonstanten und Biomagnifikationsfaktoren (BMF_K)

k_g (Wachstumskonstante, Tag ⁻¹):	Einsatzwert (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (Gesamtausscheidungskonstante, Tag ⁻¹):	Einsatzwert (95 % CI)
k_{2g} (wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante, Tag ⁻¹):	Einsatzwert (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (gemessene Konzentration zum Zeitpunkt Null, Konzentration in den Fischen am Ende der Aufnahmeperiode) (µg/g):	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (abgeleitete Konzentration zum Zeitpunkt Null der Ausscheidungsphase; µg/g):	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾
I (festgelegte Futteringestionsrate; g Futter/g Fisch/Tag):	Einsatzwert
I_g (effektive Fütterungsrate, wachstumskorrigiert; g Futter/g Fisch/Tag) ⁽²⁾ :	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾
C_{Futter} (Stoffkonzentration im Futter; µg/g):	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾
α (stoffspezifische Assimilationseffizienz):	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾
BMF _K (kinetischer nahrungsbezogener BMF):	Einsatzwert (95 % CI) ⁽¹⁾
BMF _K (wachstumskorrigierter kinetischer nahrungsbezogener BMF):	Einsatzwert (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (wachstumskorrigierte Halbwertszeit, in Tagen):	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾
L_c (Lipidkorrekturfaktor):	Einsatzwert
BMF _{KgL} (lipidkorrigierter wachstumskorrigierter kinetischer BMF):	Einsatzwert
BMF _{SS-L} (indikativer lipidkorrigierter BMF bei stationärem Zustand) ⁽²⁾ :	Einsatzwert ± SD ⁽²⁾

1) CI: Konfidenzintervall (falls schätzbar)

2) SD: Standardabweichung (falls schätzbar)

LITERATURHINWEISE

- (1) Kapitel C.13 dieses Anhangs, Biokonzentration: Durchfluss-Fischtest.
- (2) Kapitel A.6 dieses Anhangs, Löslichkeit in Wasser
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035
- (4) Kapitel A.8 dieses Anhangs, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.
- (5) Kapitel A.24 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser, HPLC-Methode.
- (6) Kapitel A.23 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient (1-Oktanol/Wasser): Methode zur Prüfung unter langsamem Rühren.
- (7) Kapitel C.7 dieses Anhangs, *Hydrolyse als Funktion des pH*.
- (8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, Frankreich.
- (9) Kapitel A.5 dieses Anhangs, Oberflächenspannung wässriger Lösungen.
- (10) Kapitel A.4 dieses Anhangs, Dampfdruck.
- (11) Kapitel C.4 dieses Anhangs, „Leichte“ biologische Abbaubarkeit.
- (12) Kapitel C.29 dieses Anhangs, „Leichte“ biologische Abbaubarkeit - C.29, Leichte biologische Abbaubarkeit —
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Abrufbar unter: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.
- (22) Kapitel C.47 dieses Anhangs, Toxizitätsprüfung an Fischen im frühen Entwicklungsstadium.
- (23) Kapitel C.15 dieses Anhangs, Fish, Kurzfristige Toxizitätsprüfung an Embryonen und Jungfischen mit Dottersack.
- (24) Kapitel C.14 dieses Anhangs, Fische, Wachstumstest an Jungfischen.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, Frankreich.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study - Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijnbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.
- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, Texas, USA.

- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.
- (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I - Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II - Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, Frankreich.

Anlage 1

DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Assimilationseffizienz (α) - ein Maß für die relative Stoffmenge, die aus dem Darm in den Organismus absorbiert wird (α ist einheitslos, wird jedoch häufig als Prozentsatz und nicht als Bruchteil ausgedrückt).

Aufnahmekonstante (k_1) - der numerische Wert, der die Geschwindigkeit des Anstiegs der Konzentration des Prüfstoffs in oder auf den Versuchsfischen (oder bestimmten Geweben dieser Fische) definiert, wenn die Fische diesem Stoff ausgesetzt sind (wobei (k_1) in $l\ kg^{-1}\ Tag^{-1}$ angegeben wird).

Ausscheidungs- oder Post-Expositionsphase - die Zeit nach der Umsetzung der Versuchsfische aus dem prüfstoffhaltigen Medium in ein prüfstofffreies Medium, in der der Abbau (oder der Nettoverlust) des Prüfstoffs in den Versuchsfischen (oder bestimmten Geweben dieser Fische) untersucht wird.

Ausscheidungskonstante (k_2) - der numerische Wert, der die Geschwindigkeit der Abnahme der Prüfstoffkonzentration in den Versuchsfischen (oder bestimmten Geweben dieser Fische) definiert, die auf die Umsetzung der Versuchsfische aus einem prüfstoffhaltigen Medium in ein prüfstofffreies Medium folgt (wobei k_2 in Tag^{-1} angegeben wird).

Bioakkumulation - die Anreicherung des Prüfstoffs in einem Organismus auf ein Niveau, das das Konzentrationsniveau im Atmungsmedium (z. B. Wasser für einen Fisch oder Luft für ein Säugetier), im Futter oder in beidem übersteigt (1).

Biokonzentration - die Anreicherung des Prüfstoffs in oder auf einem Organismus (oder bestimmten Geweben dieses Organismus) im Verhältnis zu seiner Konzentration im umgebenden Medium.

Biokonzentrationsfaktor (BCF oder K_B) - das Verhältnis (gemessen zu einem beliebigen Zeitpunkt während der Aufnahme phase dieses Akkumulationstests) der Konzentration des Prüfstoff in/auf den Fischen oder bestimmten Fischgeweben (C_f in mg/kg) zur Konzentration des Prüfstoff im umgebenden Medium (C_w in mg/l), ausgedrückt in $l \cdot kg^{-1}$. Es ist zu beachten, dass Korrekturen um das Wachstum und/oder einen Standardlipidgehalt nicht berücksichtigt werden.

Biokonzentrationsfaktor bei stationärem Zustand oder *steady-state*-Biokonzentrationsfaktor (BCF_{SS}) - er ändert sich über einen längeren Zeitraum nicht wesentlich; die Konzentration des Prüfstoffs im umgebenden Medium ist während dieser Zeit konstant (siehe Definition des Begriffs „Stationärer Zustand“).

Biomagnifikation - die Anreicherung des Prüfstoffs in oder auf einem Organismus (oder bestimmten Geweben dieses Organismus) im Verhältnis zu seiner Konzentration im Futter.

Biomagnifikationsfaktor (BMF) - die Konzentration eines Stoffs in einem Raubfisch im Verhältnis zur Konzentration desselben Stoffs in dessen Beute (oder Nahrung) bei stationärem Zustand. Bei der hier beschriebenen Prüfmethode wird die aquatische Exposition sorgfältig vermieden, weshalb ein BMF-Wert aus dieser Prüfmethode nicht unmittelbar mit einem BMF-Wert aus einem Feldversuch (bei dem die aquatische Exposition und die Exposition über das Futter miteinander kombiniert werden können) vergleichbar ist.

Chemikalie - ein Stoff oder Gemisch.

Expositions- oder Aufnahmephase - die Zeit, in der die Fische dem Prüfstoff ausgesetzt sind.

Festphasen-Mikroextraktion (SPME) - ein lösungsmittelfreies Analyseverfahren, das für verdünnte Systeme entwickelt wurde. Bei dieser Methode wird eine polymerbeschichtete Faser der gasförmigen oder flüssigen Phase mit dem untersuchten Analyt ausgesetzt. Im Allgemeinen wird eine Mindestanalysezeit angesetzt, damit in Bezug auf die Prüfspezies Gleichgewichtsbedingungen zwischen der festen und flüssigen Phase hergestellt werden können. Anschließend kann das untersuchte Analyt je nach Nachweisverfahren direkt aus der Faser oder nach Extraktion aus der Faser in ein Lösungsmittel bestimmt werden.

Futterbezogener Biomagnifikationsfaktor (futterbezogener BMF) - zum Zwecke dieser Prüfmethode verwendeter Begriff zur Beschreibung des Ergebnisse der Prüfung mit Exposition über das Futter, bei der eine Exposition über das Wasser sorgfältig vermieden wird, weshalb der futterbezogene BMF-Wert aus dieser Prüfmethode nicht unmittelbar mit einem BMF-Wert aus einer Feldstudie (bei der die aquatische Exposition und die Exposition über das Futter miteinander kombiniert werden können) vergleichbar ist.

Futteringestionsrate (I) - die pro Fisch und Tag aufgenommene durchschnittliche Futtermenge, bezogen auf das geschätzte durchschnittliche Körpergewicht des ganzen Fisches (ausgedrückt in g Futter/g Fisch/Tag).

Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) - ein Maß für die Konzentration des Kohlenstoffs aus gelösten organischen Quellen im Prüfmedium.

Gesamter organischer Kohlenstoff (TOC) - ein Maß für die Konzentration des Kohlenstoffs aus allen organischen Quellen im Prüfmedium, einschließlich partikulären und gelösten Quellen.

Kinetischer Biokonzentrationsfaktor (BCF_K) - das Verhältnis der Aufnahmekonstanten, k_1 , zur Ausscheidungskonstanten, k_2 (d. h. k_1/k_2 – siehe entsprechende Definitionen in dieser Anlage). Im Prinzip sollte der Wert mit dem BCF_{SS} vergleichbar sein (siehe Definition), es können jedoch Abweichungen auftreten, wenn der stationäre Zustand unschlüssig war oder der kinetische BCF wachstumskorrigiert wurde.

Lipidstandardisierter kinetischer Biokonzentrationsfaktor (BCF_{KL}) - Standardisierung auf einen Fisch mit einem Lipidgehalt von 5 %.

Lipidstandardisierter wachstumskorrigierter kinetischer Biokonzentrationsfaktor (BCF_{KgL}) - Standardisierung auf einen Fisch mit einem Lipidgehalt von 5 % mit Korrektur um das Wachstum während der Versuchsdauer, siehe Anlage 5.

Lipidstandardisierter Biokonzentrationsfaktor im Gleichgewichtszustand (BCF_{SSL}) - Standardisierung auf einen Fisch mit einem Lipidgehalt von 5 %.

Mehrkomponentiger Stoff - zum Zwecke der REACH-Verordnung definiert als Stoff, der bei einer Konzentration zwischen 10 % und 80 % (w/w) mehrere Hauptkomponenten aufweist.

Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{OW}) - das Verhältnis der Löslichkeit eines Stoffs in *n*-Octanol und Wasser in stabilem Zustand (Methoden A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); auch als P_{OW} bezeichnet. Der Logarithmus von K_{OW} dient als Indikator des Potenzials eines Stoffes zur Biokonzentration in Wasserorganismen.

Partikulärer organischer Kohlenstoff (POC) - ein Maß für die Konzentration von Kohlenstoff aus suspendierten organischen Quellen im Prüfmedium.

Prüfchemikalie - ein Stoff oder ein Gemisch, der bzw. das nach dieser Methode geprüft wird.

Stationärer Zustand oder *Steady-state* - gilt in der graphischen Darstellung des gegen die Zeit aufgetragenen Prüfstoffs im Fisch (C_f) als erreicht, wenn die Kurve parallel zur Zeitachse verläuft und drei aufeinanderfolgende C_f -Analysen, die an Proben durchgeführt werden, die im Abstand von mindestens zwei Tagen entnommen wurden, um nicht mehr als ± 20 % voneinander abweichen, bzw. wenn es in der Zeit zwischen der ersten und letzten aufeinanderfolgenden Analyse keinen bedeutenden Anstieg von C_f gibt. Werden gepoolte Proben analysiert, sind mindestens vier aufeinanderfolgende Analysen erforderlich. Für Prüfstoffe, die nur langsam aufgenommen werden, ist ein zeitlicher Abstand zwischen den Probenahmen von sieben Tagen geeigneter.

UVCB-Stoffe - Stoffe mit unbekannter oder variabler Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

LITERATURHINWEISE

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.
- (2) Kapitel A.8 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser): Schüttelmethode.
- (3) Kapitel A.24 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser): HPLC-Methode.
- (4) Kapitel A.23 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient (1-Octanol/Wasser): Methode mit langsamem Rühren.

Anlage 2

CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

Komponente	Limit-Konzentration
Partikel	5 mg/l
Gesamter organischer Kohlenstoff	2 mg/l
Nicht ionisierter Ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Kupfer	1 µg/l
Eisen	1 µg/l
Blei	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Quecksilber	100 ng/l
Silber	100 ng/l

Anlage 3

FÜR DIE PRÜFUNG EMPFOHLENE FISCHARTEN

Empfohlene Arten	Empfohlener Prüftemperaturbereich (°C)	Empfohlene Gesamtlänge des Versuchstiers (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisch	20 – 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Dickkopfelritze	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpfen	20 – 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck & Schlegel) Reiskärpfling	20 – 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 – 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Blauer Sonnenbarsch	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Regenbogenforelle	13 – 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Dreistacheliger Stichling	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Es ist zu beachten, dass bei der Prüfung als solcher das Gewicht das bevorzugte Maß für die Berechnung der Größen- und Wachstumskonstanten ist. Es wird jedoch anerkannt, dass die Länge geeigneter ist, wenn die Fische vor Versuchsbeginn visuell (aus der Stammpopulation) ausgewählt werden müssen.

(3) Dieser Längenbereich ist in den Prüfmethode für neue chemische Stoffe angegeben und basiert auf dem *Chemical Substances Control Law (CSCL)* Japans.

Die folgenden Ästuar- und Meeresspezies wurde weniger häufig verwendet:

Augenfleck-Umber	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Edelsteinkärpfling	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Gezeiten-Ährenfisch	(<i>Menidia beryllina</i>)
Juwelflussbarsch	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Englische Seezunge	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Geweihsgröppe	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Dreistacheliger Stichling	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Seebarsch	(<i>Dicentracus labrax</i>)
Ukelei	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Die in vorstehender Tabelle genannten Süßwasserfische sind leicht zu züchten oder stehen größtenteils ganzjährig zur Verfügung, wohingegen die Verfügbarkeit der Ästuarinen- und Meeresspezies teilweise auf bestimmte Länder beschränkt ist. Diese Arten können in Teichwirtschaften oder im Labor unter krankheits- und parasitenkontrollierten Bedingungen gezüchtet und aufgezogen werden, damit gesunde Versuchstiere bereitstehen, deren Abstammung bekannt ist. Diese Fische sind in vielen Teilen der Welt verfügbar.

LITERATURHINWEISE

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

Anlage 4

PROBENAHRMEPLÄNE FÜR PRÜFUNGEN MIT AQUATISCHER EXPOSITION UND MIT EXPOSITION ÜBER DAS FUTTER

1. Hypothetisches Beispiel eines Probenahmeplans für die vollständige Biokonzentrationsprüfung mit aquatischer Exposition eines Stoffs mit $\log K_{OW} = 4$

Beprobung von Fischen	Probenahmeplan		Anzahl Wasserproben ⁽¹⁾	Anzahl Fische je Probe ⁽¹⁾
	Erforderliche Mindesthäufigkeit (Tage) ⁽²⁾	Zusätzliche Probenahmen (Tage) ⁽²⁾		
Aufnahmephase				
1	-1 0		2 ⁽³⁾ (2)	4 ⁽⁴⁾ (3 ⁽⁶⁾)
2	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
3	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
4	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
5	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾ (3 ⁽⁶⁾)
Ausscheidungsphase				Umsetzung der Fische in prüfstofffreies Wasser
7	5,0	5,3	2	4 (4)
8	5,9	7,0	2	4 (4)
9	9,3	11,2	2	4 (4)
10	14,0	17,5	2	4 – 8 ⁽⁵⁾ (4+3 ⁽⁶⁾)
INSGESAMT				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

- 1) Die Werte in Klammern entsprechen der Zahl der zu entnehmenden Proben (Wasser, Fische), wenn eine zusätzliche Probenahme durchgeführt wird.
- 2) Die Vorversuchsschätzung von k_2 bei einem $\log K_{OW}$ von 4,0 ergibt $0,652 \text{ Tage}^{-1}$. Die Gesamtdauer des Versuchs ist auf $3 \times t_{SS} = 3 \times 4,6$ Tage, d. h. 14 Tage, festgelegt. Für die Schätzung von t_{SS} siehe Anlage 5.
- 3) Die Wasserprobe entnehmen, nachdem mindestens 3 „Kammervolumen“ gezogen wurden.
- 4) Diese Fische werden der Stammpopulation entnommen.
- 5) Sind größere Genauigkeit oder Metabolismusuntersuchungen erforderlich, wozu mehr Fische benötigt werden, sollten diese insbesondere am Ende der Aufnahme- und der Ausscheidungsphase entnommen werden (siehe Nummer 40).

- 6) Zur Analyse des Lipidgehalts können mindestens 3 zusätzliche Fische erforderlich werden, wenn die Fische, die zur Bestimmung der Prüfstoffkonzentrationen zu Beginn des Tests, am Ende der Aufnahmephase und am Ende der Ausscheidungsphase beprobt wurden, nicht verwendet werden können. Es ist zu beachten, dass es in vielen Fällen möglich sein sollte, nur die 3 Kontrollfische zu verwenden (siehe Nummer 56).

2. Hypothetisches Beispiel eines Probenahmeplans für die Bioakkumulationsprüfung eines Stoffs mit Exposition über das Futter nach 10 Tagen Aufnahme und 42 Tagen Ausscheidung

Probenahmezeitpunkt	Probenahmeplan		Anzahl Futterproben	Anzahl Fische je Probe	
	Tag der Phase	Zusätzliche Fischproben?		Prüfgruppe	Kontrollgruppe
Aufnahmephase					
1	0	Möglich ⁽¹⁾⁽²⁾	3 – Prüfgruppe 3 – Kontrollgruppe ⁽¹⁾	0	5 – 10 (8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Ja ⁽⁴⁾	3 – Prüfgruppe 3 – Kontrollgruppe ⁽¹⁾	10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
Ausscheidungsphase					
3	1	Ja ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Ja ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Ja ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
INSGESAMT				59 – 120 (63 – 126) ^(4,5)	50 – 110 (56 – 116) ^(4,5)

- 1) 3 Futterproben aus der Kontroll- und der Prüfgruppe, die auf Prüfstoffkonzentrationen und Lipidgehalt analysiert wurden.
- 2) Die Fische werden möglichst zu Beginn des Versuchs aus der Stammpopulation entnommen; mindestens 3 Fische aus der Stammpopulation sollten zu Versuchsbeginn auf ihren Lipidgehalt untersucht werden.
- 3) Die (optionale) Probenahme zu Beginn der Aufnahmephase liefert Daten für die Berechnung der Assimilation des Prüfstoffs über das Futter, die mit Assimilationseffizienzdaten aus der Ausscheidungsphase verglichen werden können.
- 4) 5 zusätzliche Fische können für Gewebeanalysen entnommen werden.
- 5) Zur Analyse des Lipidgehalts können mindestens 3 zusätzliche Fische erforderlich werden, wenn die Fische, die zur Bestimmung der Prüfstoffkonzentrationen bei Versuchsbeginn, am Ende der Aufnahmephase und am Ende der Ausscheidungsphase beprobt wurden, nicht verwendet werden können. Es ist zu beachten, dass es in vielen Fällen möglich sein sollte, nur die 3 Kontrollfische zu verwenden.

verwenden (siehe Nummern 56 und 153).

Anmerkung zu Phasen und Probenahmezeitpunkten: Die Aufnahmephase beginnt mit der ersten Verabreichung des dotierten Futters. Ein Versuchstag reicht von einer Fütterung bis kurz vor die nächste Fütterung 24 Stunden später. Die erste Probenahme (1 in der Tabelle) sollte kurz vor der ersten Fütterung (z. B. 1 Stunde früher) erfolgen. Im Rahmen eines Versuchs sollte die Probenahme idealerweise kurz vor der Fütterung am Folgetag (d. h. ca. 23 Stunden nach der Fütterung am Probenahmetag) durchgeführt werden. Die Aufnahmephase endet kurz vor der ersten Verabreichung des undotierten Futters, wenn die Ausscheidungsphase beginnt (es muss davon ausgegangen werden, dass die Fische aus der Prüfgruppe das dotierte Futter in den dazwischenliegenden 24 Stunden seit der letzten Fütterung mit dotiertem Futter wahrscheinlich noch verdauen). Dies bedeutet, dass die Probe am Ende der Aufnahmephase kurz vor der ersten Verfütterung des undotierten Futters und die erste Probe der Ausscheidungsphase ungefähr 23 Stunden nach der ersten Verfütterung des undotierten Futters entnommen werden sollte.

Anlage 5

ALLGEMEINE BERECHNUNGEN

1. Einleitung
2. Vorabschätzung der Dauer der Aufnahmephase
3. Vorabschätzung der Dauer der Ausscheidungsphase
4. Sequentielle Methode: Bestimmung der Ausscheidungs-(*Eliminations-*)*konstanten* k_2
5. Sequenzielle Methode: Bestimmung der Aufnahmekonstanten k_1 (nur *bei aquatischer Exposition*)
6. Simultane Methode für die Berechnung der Aufnahme- und der Ausscheidungskonstanten (nur bei aquatischer Exposition)
7. Korrektur um den Effekt der die Verdünnung durch Wachstum zur Bestimmung des kinetischen BCF und des BMF
8. Standardisierung des Lipidgehalts auf 5% (nur bei aquatischer Exposition)

1. EINLEITUNG

Das allgemeine Modell für Bioakkumulation in Fischen im aquatischen Milieu beschreibt den Aufnahme- und den Ausscheidungsprozess; die Aufnahme des Prüfstoffs über das Futter wird dabei ignoriert. Die Differentialgleichung (dC_f/dt) zur Beschreibung der Rate der Veränderung der Konzentration im Fisch ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$) wird angegeben durch (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$$

[Gleichung A5.1]

Dabei gilt:

k_1 = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Aufnahme des Stoffes durch den Fisch ($1\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$).

k_2 = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Ausscheidung durch den Fisch (Tag^{-1}).

k_g = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung des Fischwachstums (Effekt der Verdünnung durch Wachstum) (Tag^{-1})

k_m = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der metabolischen Umwandlung (Tag^{-1})

k_m = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Egestion (Tag^{-1})

C_w = Konzentration in Wasser ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

C_f = Konzentration im Fisch ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Nassgewicht).

Bei bioakkumulierenden Substanzen kann davon ausgegangen werden, dass ein zeitgewichteter Durchschnitt (*time-weighted average*, TWA) innerhalb des zulässigen Schwankungsbereichs die relevanteste Expositionskonzentration in Wasser (C_w) ist (siehe Nummer 24). Es wird empfohlen, nach dem Verfahren in Anlage 6 der Prüfmethode TM C.20 (2) einen TWA für die Wasserkonzentration zu berechnen. Es wird darauf hingewiesen, dass die logarithmische Umwandlung der Konzentration im Wasser sinnvoll ist, wenn ein exponentieller Zerfall zwischen Erneuerungsphasen erwartet wird, z. B. bei semistatischem Versuchsaufbau. In einem Durchflusssystem ist die logarithmische Umwandlung der Expositionskonzentrationen u. U. nicht notwendig. Werden zeitgewichtete Durchschnittswerte der Wasserkonzentrationen berechnet, sollten diese angegeben und für die nachfolgenden Berechnungen verwendet werden.

Bei einem Standard-BCF-Fischtest lassen sich Aufnahme und Ausscheidung als zwei kinetische Prozesse erster Ordnung beschreiben.

$$\text{Aufnahmerate} = k_1 \times C_w \quad [\text{Gleichung A5.2}]$$

$$\text{Gesamtausscheidungsrate} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Gleichung A5.3}]$$

Bei stationärem Zustand und davon ausgehend, dass Wachstum und Metabolisierung unerheblich sind (*d. h.* die Werte für k_g und k_m sind nicht von Null zu unterscheiden), entspricht die Aufnahmerate der Ausscheidungsrate, sodass die Gleichungen A5.2 und A5.3 kombiniert Folgendes ergeben:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Gleichung A5.4}]$$

Dabei gilt:

C_{f-SS} = Konzentration im Fisch bei stationärem Zustand ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Nassgewicht).

C_{w-SS} = Konzentration im Wasser bei stationärem Zustand ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Der Quotient k_1/k_2 wird als kinetischer BCF (BCF_K) bezeichnet und sollte dem BCF bei stationärem Zustand (BCF_{SS}) entsprechen, der aus dem Verhältnis der Konzentration im

Fisch bei stationärem Zustand zur Konzentration im Wasser errechnet wurde. Jedoch können Abweichungen auftreten, wenn der stationäre Zustand unsicher ist oder wenn der kinetische BCF wachstumskorrigiert wurde. Da k_1 und k_2 jedoch Konstanten sind, braucht zur Ableitung eines BCF_K kein stationärer Zustand erreicht zu werden.

Gestützt auf diese Gleichungen erster Ordnung enthält Anlage 5 die allgemeinen Berechnungen, die sowohl für die Bioakkumulationsmethode mit aquatischer Exposition als auch für die Bioakkumulationsmethode mit Exposition über das Futter erforderlich sind. Die Abschnitte 5, 6 und 8 sind zwar nur für die Methode mit aquatischer Exposition relevant, werden jedoch als „allgemeine“ Verfahren miteinbezogen. Die sequenziellen Methoden (Abschnitte 4 und 5) und die Simultanmethode (Abschnitt 6) ermöglichen die Berechnung von Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten, die zur Ableitung kinetischer BCF verwendet werden. Die sequenzielle Methode für die Bestimmung von k_2 (Abschnitt 4) ist für die futterbezogene Methode wichtig, da sie sowohl zur Berechnung der Assimilationseffizienz als auch des BMF benötigt wird. Anlage 7 enthält konkrete Berechnungsvorschriften für die futterbezogene Methode.

2. VORRAUSSCHÄTZUNG DER DAUER DER AUFNAHMEPHASE

Vor der Durchführung des Versuchs kann auf Basis empirischer Beziehungen zwischen k_2 und dem *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{OW}) bzw. zwischen k_1 und BCF ein Schätzwert für k_2 und somit eine Prozentziffer für die zum Erreichen des stationären Zustands benötigten Zeit abgeleitet werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die Gleichungen in diesem Abschnitt nur für den Fall gelten, dass Aufnahme und Ausscheidung der Kinetik erster Ordnung folgen. Ist dies eindeutig nicht der Fall, empfiehlt es sich, den Rat eines Biostatikers und/oder Pharmakokinetikers einzuholen, um die Aufnahmephase vorauszuschätzen.

k_2 (Tag^{-1}) lässt sich nach verschiedenen Methoden schätzen. Beispielsweise könnten als erstes die folgenden empirischen Beziehungen herangezogen werden⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{OW}$$

$$(r^2 = 0,95) [(3); \text{Gleichung A5.5}]$$

oder

(1) Wie bei jeder empirischen Beziehung sollte überprüft werden, ob der Prüfstoff innerhalb des Anwendbarkeitsbereichs der Beziehung liegt.

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad \text{[Gleichung A5.6]}$$

Dabei gilt:

$$k_1 = 520 \times W^{-0.32} \text{ (für Stoffe mit } \log K_{OW} > 3) \quad (r^2 = 0,85) \quad \text{[(4); Gleichung A5.7]}$$

$$\text{und } BCF = 10^{(0,910 \cdot \log K_{OW} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) \text{ [(5); Gleichung A5.8]}$$

W = mittleres Gewicht des behandelten Fisches (Nassgewicht in g) am Ende der Aufnahme/zu Beginn der Ausscheidung⁽¹⁾

Siehe (6) für andere verwandte Beziehungen. Es kann von Vorteil sein, für die Schätzung von k_2 komplexere Modelle zu verwenden, beispielsweise wenn mit einer erheblichen Metabolisierung gerechnet werden muss (7) (8). Da dieses Modell jedoch komplexer ist, sollten Vorausschätzungen mit Vorsicht ausgewertet werden. Das Vorhandensein von Nitro-Gruppen könnte auf eine schnelle Metabolisierung hindeuten, was aber nicht immer der Fall ist. Daher sollte der Anwender die Ergebnisse prädiktiver Methoden bei der Planung einer Studie gegen Informationen zur chemischen Struktur und andere relevante Informationen (z. B. aus Vorversuchen) abwägen.

Die bis zum Erreichen eines bestimmten Prozentsatzes des stationären Zustands erforderliche Zeit lässt sich – durch Anwendung des Schätzwertes k_2 – aus der allgemeinen kinetischen Gleichung zur Beschreibung von Aufnahme und Elimination (Kinetik erster Ordnung) ableiten, wobei davon ausgegangen wird, dass Wachstum und Metabolisierung unerheblich sind. Kommt es während des Versuchs zu erheblichem Wachstum, sind die nachfolgend beschriebenen Schätzungen nicht zuverlässig. In solchen Fällen ist die Anwendung des wachstumskorrigierten k_{2g} vorzuziehen, wie weiter unten beschrieben (siehe Abschnitt 7 dieser Anlage):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \quad \text{[Gleichung A5.9]}$$

oder, wenn C_w konstant ist:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[Gleichung A5.10]}$$

(1) Das Gewicht der Fische am Ende der Aufnahmephase kann geschätzt werden anhand von Daten aus Vorversuchen oder von Informationen über die wahrscheinliche Wachstumszunahme der Versuchsspezies ab einem typischen Test-Startgewicht während der üblichen Aufnahmedauer (z. B. 28 Tage).

Bei Annäherung an den stationären Zustand ($t \rightarrow \infty$) kann Gleichung A5.10 gekürzt werden (vgl. (9)(10)) zu

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{[Gleichung A5.11]}$$

oder

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{K_1}{K_2} = BCF \quad \text{[Gleichung A5.12]}$$

$BCF \times C_w$ ist somit eine Annäherung an die Konzentration im Fisch bei stationärem Zustand (C_{f-ss}). [Anm.: Der gleiche Ansatz kann auch bei der futterbezogenen Prüfung zur Schätzung eines BMF bei stationärem Zustand angewendet werden. In diesem Fall wird in den obigen Gleichungen der BCF durch den BMF und C_w durch C_{Futter} , der Konzentration im Futter, ersetzt]

Gleichung A5.10 kann umformuliert zu

$$C_f = C_{f-ss}(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[Gleichung A5.13]}$$

oder

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[Gleichung A5.14]}$$

Bei Anwendung von Gleichung A5.14 kann die Zeit bis zum Erreichen eines gewissen Prozentsatzes des stationären Zustands vorausgeschätzt werden, wenn k_2 zuvor nach den Gleichungen A5.5 oder A5.6 geschätzt wurde.

Als Richtschnur gilt, dass die für die Ableitung statistisch brauchbarer Daten (BCF_K) statistisch optimale Aufnahmedauer der Zeit entspricht, die benötigt wird, damit die gegen die lineare Zeit aufgetragene Logarithmuskurve der Prüfstoffkonzentration in den Fischen mindestens 50 % des stationären Zustands (*d. h.* $0,69/k_2$), jedoch nicht mehr als 95 % des stationären Zustands (*d. h.* $3,0/k_2$) erreicht (11). Geht die Akkumulation über 95 % des stationären Zustands hinaus, kann ein BCF_{SS} berechnet werden.

Die Zeit bis zum Erreichen eines 80 %igen stationären Zustands entspricht (nach Gleichung A5.14)

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[Gleichung A5.15]}$$

oder

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{[Gleichung A5.16]}$$

Gleichermaßen gilt für einen 95 %igen stationären Zustand:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Gleichung A5.17}]$$

Demnach entspräche beispielsweise die Dauer der Aufnahme phase (d. h. die Zeit bis zum Erreichen eines bestimmten Prozentsatzes des stationären Zustands, z. B. t_{80} oder t_{95}) für einen Prüfstoff mit $\log K_{OW} = 4$ (unter Anwendung der Gleichungen A5.5, A5.16 und A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ Tage}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ Tage (59 Stunden)}$$

oder $t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ Tage (110 Stunden)}$

Alternativ kann die Formel

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (Stunden)} \quad [\text{Gleichung A5.18}]$$

angewendet werden, um die Zeit bis zum Erreichen des tatsächlichen stationären Zustands (t_{eSS}) zu berechnen (12). Für einen Prüfstoff mit $\log K_{OW} = 4$ ergibt dies

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ Stunden}$$

3. VORAUSSCHÄTZUNG DER DAUER DER AUSSCHIEDUNGSPHASE

Die Zeit, die zur Reduzierung der Körperbelastung auf einen gewissen Prozentsatz der Anfangskonzentration benötigt wird, lässt sich ebenfalls nach der allgemeinen kinetischen Gleichung über die Aufnahme und Ausscheidung (wobei eine Kinetik erster Ordnung vorausgesetzt wird, siehe Gleichung A5.9) vorausschätzen (1) (13).

Für die Ausscheidungsphase wird C_w (oder C_{Futter} für die futterbezogene Prüfung) als Null angenommen. Die Gleichung kann reduziert werden auf

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Gleichung A5.19}]$$

oder

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Gleichung A5.20}]$$

wobei $C_{f,0}$ der Konzentration zu Beginn der Ausscheidungsphase entspricht.

Eine 50 %ige Ausscheidung wird erreicht zum Zeitpunkt (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

oder

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Gleichermaßen wird eine 95 %ige Ausscheidung erreicht zum Zeitpunkt

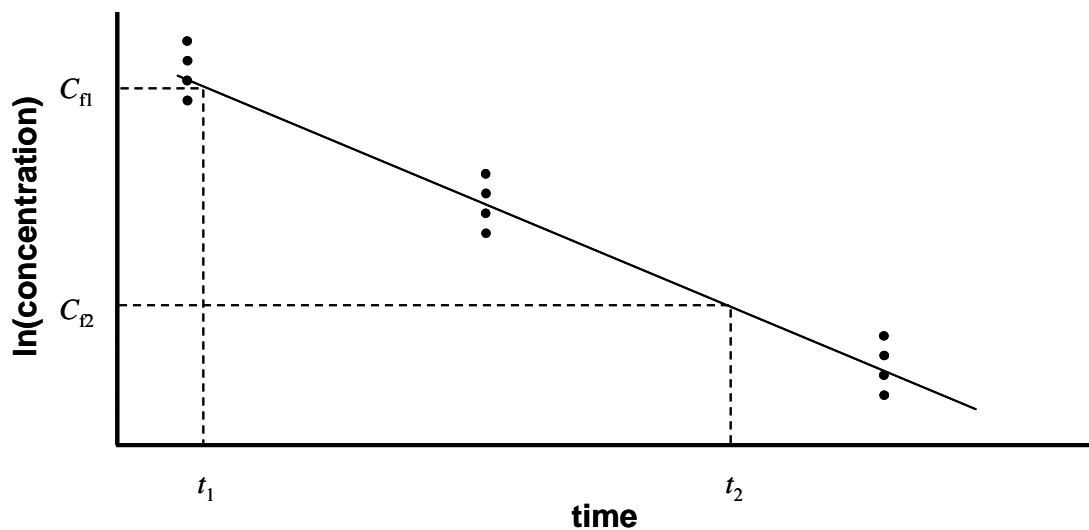
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Bei 80 %igen Aufnahme in der ersten Phase ($1,6/k_2$) und 95 %igen Elimination in der Ausscheidungsphase ($3,0/k_2$) wird die Ausscheidungsphase ungefähr doppelt solange dauern wie die Aufnahmephase.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Schätzungen auf der Annahme beruhen, dass die Aufnahme- und Ausscheidungsmuster einer Kinetik erster Ordnung folgen. Wenn es sich jedoch eindeutig nicht um eine Kinetik erster Ordnung handelt, sind diese Schätzungen ungültig.

4. SEQUENTIELLE METHODE: BESTIMMUNG DER AUSSCHIEDUNGS-(ELIMINATIONS-)KONSTANTEN K_2

Bisher wurde davon ausgegangen, dass sich die meisten Biokonzentrationsdaten mit einem einfachen 2-Kammer/2-Parameter-Modell hinreichend gut beschreiben lassen, wie die gradlinige Kurve, die die Punkte für die Konzentrationen in den Fischen (auf einer logarithmischen Skala) während der Ausscheidungsphase annähert, zeigt.



Es ist zu beachten, dass Abweichungen von einer Geraden auf ein komplexeres Ausscheidungsmuster als eine Kinetik erster Ordnung hindeuten können. Für eine Auswertung von Ausscheidungsvorgängen, die von der Kinetik erster Ordnung abweichen, kann eine graphische Methode angewandt werden.

Zur Berechnung von k_2 für mehrere (Probenahme-)Zeitpunkte ist eine lineare Regression von $\ln(\text{Konzentration})$ gegen die Zeit durchzuführen. Die Steigung der Regressionskurve entspricht einer Schätzung der Ausscheidungskonstanten $k_2^{(1)}$. Anhand des Achsenabschnitts lässt sich die mittlere Konzentration in den Fischen zu Beginn der Ausscheidungsphase ($C_{0,d}$; entspricht der mittleren Konzentration am Ende der Aufnahmephase) leicht berechnen (einschließlich Fehlergrenzen)⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{Achsenabschnitt}} \quad [\text{Gleichung A5.21}]$$

Gibt es nur zwei (Probenahme-)Zeitpunkte (wie beim minimierten Versuchsplan), werden zur Berechnung von k_2 die zwei durchschnittlichen Konzentrationen in der folgenden Gleichung ersetzt:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Gleichung A5.22}]$$

Dabei sind $\ln(C_{f1})$ und $\ln(C_{f2})$ die natürlichen Logarithmen der Konzentrationen zu den

(1) In den meisten Programmen, die eine lineare Regression unterstützen, werden auch Standardfehler und das Konfidenzintervall (CI) der Schätzungen angegeben, z. B. Datenanalysefunktionen in Microsoft Excel.

Zeitpunkten t_1 bzw. t_2 , und t_2 und t_1 entsprechen den Zeitpunkten im Verhältnis zum Beginn der Ausscheidung, an dem die beiden Probenahmen erfolgt sind⁽¹⁾.

5. SEQUENZIELLE METHODE: BESTIMMUNG DER AUFNAHMEKONSTANTEN k_1 (NUR BEI AQUATISCHER EXPOSITION)

Für die Bestimmung von k_1 auf Basis eines vorhandenen Satzes von über die Zeit ermittelten Konzentrationsdaten für die Aufnahmephase ist ein für folgendes Modell geeignetes Computerprogramm anzuwenden:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[Gleichung A5.23]}$$

wobei k_2 aus der vorangegangenen Berechnung stammt und $C_f(t)$ und $C_w(t)$ den Konzentrationen in den Fischen bzw. im Wasser zum Zeitpunkt t entsprechen.

Gibt es nur zwei (Probenahme-)zeitpunkte (wie beim minimierten Versuchsplan), ist zur Berechnung von k_1 folgende Formel anzuwenden:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad \text{[Gleichung A5.24]}$$

wobei k_2 aus der vorangegangenen Berechnung stammt und C_f der Konzentration in den Fischen zu Beginn der Ausscheidungsphase und C_w der mittleren Konzentration im Wasser während der Aufnahmephase entsprechen⁽²⁾.

Durch visuelle Überprüfung der Steigungen von k_1 und k_2 , die gegen die Daten der gemessenen Probenahmepunkte aufgetragen werden, kann die Anpassungsgüte (*Goodness-of-Fit*) bewertet werden. Sollte es sich herausstellen, dass die sequenzielle Methode zu einer unzulänglichen Schätzung von k_1 führt, sollte die simultane Methode zur Berechnung von k_1 und k_2 angewendet werden (siehe Abschnitt 6). Auch hier sollten die resultierenden Steigungen visuell mit den graphisch dargestellten Messdaten verglichen werden, um die Anpassungsgüte zu gewährleisten. Ist letztere weiterhin unzulänglich, kann dies darauf hindeuten, dass eine Kinetik erster Ordnung nicht zutrifft und andere, komplexere Modelle angewendet werden sollten.

(1) Hingegen ergibt sich bei der Methode der linearen Regression bei Anwendung dieser Formel kein Standardfehler für k_2 .

(2) Im Gegensatz zur linearen Anpassungsmethode liefert diese Methode weder einen Standardfehler noch ein Konfidenzintervall für die Schätzung von k_1 .

6. SIMULTANE METHODE FÜR DIE BERECHNUNG DER AUFNAHME- UND DER AUSSCHIEDUNGSKONSTANTEN (NUR BEI AQUATISCHER EXPOSITION)

Computerprogramme können auf Basis eines Satzes von über die Zeit ermittelten Konzentrationsdaten und dem Modell für die Bestimmung von k_1 und k_2 verwendet werden:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[Gleichung A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[Gleichung A5.26]}$$

Dabei gilt: t_c = Zeitpunkt am Ende der Aufnahmeperiode.

Aus diesem Ansatz ergeben sich unmittelbar die Standardfehler für die Schätzungen von k_1 und k_2 . Wenn k_1/k_2 in den Gleichungen A5.25 und A5.26 durch den BCF (siehe Gleichung A5.4) ersetzt wird, können der Standardfehler und das 95 %-Konfidenzintervall des BCF ebenfalls geschätzt werden. Dies ist insbesondere nützlich, wenn aufgrund einer Datenumwandlung verschiedene Schätzwerte verglichen werden. Die abhängige Variable (Fischkonzentration) kann mit oder ohne logarithmische Umwandlung angepasst und die resultierende BCF-Unsicherheit kann bewertet werden.

Da zwischen den beiden Parametern k_1 und k_2 bei gleichzeitiger Schätzung eine starke Korrelation besteht, empfiehlt es sich, k_2 zunächst nur anhand der Ausscheidungsdaten (siehe oben) zu berechnen; k_2 kann in den meisten Fällen mit relativ hoher Genauigkeit anhand der Ausscheidungskurve geschätzt werden. Anschließend kann k_1 unter Anwendung einer nichtlinearen Regression anhand der Aufnahmedaten berechnet werden⁽¹⁾. Es empfiehlt sich, die Daten bei der sequenziellen Anpassung gleichermaßen umzuwandeln.

Durch visuelle Überprüfung der resultierenden Steigungen, die gegen die Daten der gemessenen Probenahmepunkte aufgetragen werden, kann die Anpassungsgüte (*Goodness-of-Fit*) bewertet werden. Sollte es sich herausstellen, dass diese Methode zu einer unzulänglichen k_1 -Schätzung führt, sollten k_1 und k_2 nach der simultanen Methode berechnet werden. Zur visuellen Überprüfung der Anpassungsgüte sollte das angepasste

(1) Es ist zu beachten, dass die Unsicherheit der k_2 -Schätzung beim Bioakkumulationsmodell nicht hinreichend berücksichtigt wird, wenn sie bei der Anpassung von k_1 bei der sequenziellen Anpassungsmethode im Wesentlichen als konstant gilt. Die resultierende Unsicherheit des BCF ist daher bei der simultanen Anpassungsmethode anders als bei der sequenziellen Methode.

Modell wiederum mit den graphisch dargestellten Messdaten verglichen werden, und die resultierenden Parameterschätzungen für k_1 , k_2 und den resultierenden BCF sowie die Standardfehler und/oder Konfidenzintervalle nach Anpassungsarten verglichen werden.

Eine unzulängliche Anpassungsgüte kann darauf hindeuten, dass eine Kinetik erster Ordnung nicht zutrifft und andere komplexere Modelle angewandt werden sollten. Eine der häufigsten Komplikationen besteht darin, dass die Fische während des Tests wachsen.

7. **KORREKTUR UM DEN EFFEKT DER VERDÜNNUNG DURCH WACHSTUM ZUR BESTIMMUNG DES KINETISCHEN BCF UND DES BMF**

In diesem Abschnitt wird eine Standardmethode für die Korrektur um das Fischwachstum während der Prüfung (so genannter Effekt der Verdünnung durch Wachstum) beschrieben, die nur gültig ist, wenn eine Kinetik erster Ordnung zutrifft. Falls es Anzeichen dafür gibt, dass eine Kinetik erster Ordnung nicht zutrifft, empfiehlt es sich, den Rat eines Biostatikers zur Korrektur um die Verdünnung durch Wachstum einzuholen oder den nachstehend beschriebenen massebasierten Ansatz anzuwenden.

In bestimmten Fällen mangelt diese Methode für die Korrektur um die Verdünnung durch Wachstum an Genauigkeit oder funktioniert nicht (z. B. kann bei sehr langsam ausgeschiedenen Stoffen, die an schnell wachsenden Fischen analysiert werden, die abgeleitete und um die Verdünnung durch Wachstum korrigierte Ausscheidungskonstante k_{2g} sehr gering sein, sodass der Fehler bei den beiden Konstanten, die für die Ableitung herangezogen wurden, kritisch werden kann und in einigen Fällen k_g höher geschätzt wird als k_2). In solchen Fällen kann ein alternativer Ansatz (d. h. ein Massenansatz) angewendet werden, der auch dann funktioniert, wenn eine Kinetik erster Ordnung nicht zutrifft, weshalb der Korrekturbedarf entfällt. Dieser Ansatz wird am Ende dieses Abschnitts beschrieben.

Methode für die Korrektur um das Wachstum durch Subtraktion der Wachstumsrate

Bei der Standardmethode werden die individuellen Gewichts- und Längendaten in natürliche Logarithmen umgewandelt und $\ln(\text{Gewicht})$ oder $\ln(1/\text{Gewicht})$ wird gegen die Zeit (Tag) für Prüf- und Kontrollgruppen gesondert aufgetragen. Dasselbe Verfahren wird für die Daten aus der Aufnahme- und Ausscheidungsphase separat durchgeführt. Allgemein sollten bei der Korrektur um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum eher die Gewichtsdaten aus der gesamten Studie verwendet werden, um die Wachstumskonstante (k_g) abzuleiten. Doch können statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Wachstumskonstanten, die für die Aufnahme- und Ausscheidungsphase abgeleitet werden, darauf hindeuten, dass die Ausscheidungskonstante verwendet werden sollte. Anhand der Gesamtwachstumsraten für die Prüf- und Kontrollgruppen

aus den Versuchen mit aquatischer Exposition lassen sich behandlungsbedingte Wirkungen kontrollieren.

Für jede Gruppe (Prüf- und Kontrollgruppen, Einzeldaten, keine täglichen Mittelwerte) sowie für den gesamten Versuch, die Aufnahme- und die Ausscheidungsphase wird nach statistischen Verfahren eine lineare Korrelation der kleinsten Quadrate für $\ln(\text{Fischgewicht})$ bezogen auf die zur Zeit (Tag) (und für $\ln(1/\text{Gewicht})$ bezogen auf die Zeit) berechnet. Die Varianzen in den Steigungen der Kurven werden berechnet und herangezogen, um nach dem Student-*t*-Test (oder ANOVA, wenn mehr als eine Konzentration geprüft wird) die statistische Signifikanz ($p = 0,05$) der Differenz bei den Steigungen (Wachstumskonstanten) zu bewerten. Die Gewichtsdaten werden im Allgemeinen für die Korrektur um das Wachstum bevorzugt. Die auf dieselbe Weise behandelten Längendaten können für den Vergleich der Auswirkungen der Behandlung auf die Kontroll- und Prüfgruppen von Nutzen sein. Falls die Analyse der Gewichtsdaten keinen statistisch signifikanten Unterschied ergibt, können die Prüf- und Kontrolldaten gepoolt und eine Gesamtwachstumskonstante für den Versuch (k_g), d. h. die Gesamtsteigung der linearen Korrelation, berechnet werden. Wenn statistisch signifikante Unterschiede beobachtet werden, sind die Wachstumskonstanten für jede Fischgruppe und/oder Versuchsphase separat anzugeben. Die kinetische Konstante jeder behandelten Gruppe sollte dann zur Korrektur um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum dieser Gruppe herangezogen werden. Wenn zwischen den Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten Unterschiede festgestellt wurden, sollten die abgeleiteten Ausscheidungskonstanten verwendet werden.

Die berechnete Wachstumskonstante (k_g , angegeben als Tag^{-1}) kann von der Gesamtausscheidungskonstanten (k_2) abgezogen werden, um die Ausscheidungskonstante k_{2g} zu erhalten.

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad \text{[Gleichung A5.27]}$$

Die Aufnahmekonstante wird durch die wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante dividiert, um den wachstumskorrigierten kinetischen BCF, bezeichnet als BCF_{Kg} , (oder BMF_{Kg}) zu ermitteln.

$$\text{BCF}_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad \text{[Gleichung A5.28]}$$

Die Wachstumskonstante, die für einen Versuch mit Exposition über das Futter abgeleitet wird, wird in der Gleichung A7.5 verwendet, um den wachstumskorrigierten BMF_{Kg} zu berechnen (siehe Anlage 7).

Massebasierte Methode für die Korrektur um das Wachstum

Es existiert Alternative zur obigen Methode der Subtraktion der Wachstumsrate, bei der

die Korrektur um das Wachstum vermieden wird. Das Prinzip dieser alternativen Methode besteht darin, die Ausscheidungsdaten auf Basis der Masse je Ganzfisch und nicht auf Konzentrationsbasis zu verwenden:

Die Gewebekonzentrationen der Ausscheidungsphase (Masse des Prüfstoﬀs/Masseneinheit der Fische) in Prüfstoﬀ-/Fischmasse umrechnen: Konzentrationen und Gewichte der einzelnen Fische in tabellarischer Form (z. B. unter Verwendung eines Kalkulationsprogramms) zuordnen und jede Konzentration mit dem Fischgesamtgewicht für diese Messung multiplizieren, um einen Satz Prüfstoﬀ-/Fischmassedaten für alle Proben der Ausscheidungsphase zu erhalten.

Den resultierenden natürlichen Logarithmus der Prüfstoﬀmassedaten für den Versuch (Ausscheidungsphase) gegen die Zeit auftragen, wie dies normalerweise geschehen würde.

Bei der Methode mit aquatischer Exposition die Aufnahme­konstante wie üblich ableiten (siehe Abschnitte 4 und 6; es ist zu beachten, dass der „normale“ k_2 -Wert in den Kurvenanpassungsgleichungen für k_1 verwendet werden sollte) und die Ausscheidungskonstante aus den obigen Daten ableiten. Da der resultierende Wert für die Ausscheidungskonstante wachstumsunabhängig ist, da er auf Basis der Masse basis pro Ganzfisch abgeleitet wurde, sollte dieser als k_{2g} und nicht als k_2 bezeichnet werden.

8. STANDARDISIERUNG DES LIPIDGEGHALTS AUF 5% (NUR BEI AQUATISCHER EXPOSITION)

BCF-Ergebnisse (kinetisch und *steady-state*) aus Versuchen mit aquatischer Exposition sollten ebenfalls bezogen auf einen Standard-Lipidgehalt von 5 % Nassgewicht angegeben werden, es sei denn, es kann argumentiert werden, dass der Prüfstoﬀ nicht in erster Linie in den Lipiden akkumuliert (z. B. können einige perfluorierte Stoffe an Proteine gebunden sein). Die Konzentrationen in den Fischen oder der BCF müssen in einen Lipidgehalt von 5 % Nassgewicht umgerechnet werden. Wenn zum Messen der Stoffkonzentrationen und der Lipidgehalte zu allen Probenahmezeitpunkten dieselben Fische verwendet wurden, muss jede einzelne gemessene Konzentration in den Fischen um den Lipidgehalt dieses Fisches korrigiert werden.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad \text{[Gleichung A5.29]}$$

Dabei gilt:

$C_{f,L}$ = lipidstandardisierte Konzentration in den Fischen (mg kg⁻¹ Nassgewicht)

L = Lipidfraktion (basierend auf Nassgewicht)

C_f = Konzentration des Prüfstoffs in den Fischen (mg kg^{-1} Nassgewicht)

Wurde die Lipidanalyse nicht bei allen beprobten Fischen durchgeführt, wird der BCF auf Basis eines mittleren Lipidwerts normalisiert. Für den BCF bei stationärem Zustand sollte der Mittelwert, der am Ende der Aufnahmephase für die Prüfgruppe protokolliert wurde, verwendet werden. Bei der Standardisierung eines kinetischen BCF kann es Fälle geben, in denen ein anderer Ansatz gerechtfertigt ist, beispielsweise wenn sich der Lipidgehalt während der Aufnahme- oder Ausscheidungsphase erheblich geändert hat. Jedoch sollte in jedem Fall eine Fütterungsrate beibehalten, die drastische Veränderungen des Lipidgehalts auf ein Minimum begrenzt.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Gleichung A5.30}]$$

Dabei gilt:

BCF_{KL} = lipidstandardisierter kinetischer BCF (L kg^{-1})

L_n = mittlere Lipidfraktion (basierend auf Nassgewicht)

BCF_K = kinetischer BCF (L kg^{-1})

LITERATURHINWEISE

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (2) Kapitel C.20 dieses Anhangs, *Daphnia magna-Reproduktionstest*.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Dänemark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. Februar 2011. Abrufbar über: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to

estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.

- (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.

Anlage 6

GLEICHUNGEN FÜR DEN VERSUCH MIT AQUATISCHER EXPOSITION: MINIMIERTER VERSUCHSPLAN

Dieser Ansatz rechtfertigt sich dadurch, dass der Biokonzentrationsfaktor bei einer vollständigen Prüfung entweder als Biokonzentrationsfaktor bei stationärem Zustand (BCF_{SS}) bestimmt werden kann, indem das Verhältnis der Prüfstoffkonzentration im Fischgewebe zur Prüfstoffkonzentration im Wasser berechnet wird, oder als kinetischer Biokonzentrationsfaktor (BCF_K) durch Berechnung des Verhältnisses der Aufnahmekonstanten k_1 zur Ausscheidungskonstanten k_2 . Der BCF_K ist auch dann gültig, wenn während der Aufnahme keine Konzentration bei stationärem Zustand erreicht wird, vorausgesetzt, Aufnahme und Ausscheidung erfolgen ungefähr nach kinetischen Prozessen erster Ordnung.

Wird die Konzentration des Prüfstoffs im Gewebe (C_{f1}) am Ende der Exposition (t_1) bestimmt und die Konzentration im Gewebe (C_{f2}) nach Ablauf einer bestimmten Zeit (t_2) erneut gemessen, kann die Ausscheidungskonstante (k_2) nach Gleichung A5.22 (siehe Anlage 5) geschätzt werden.

Die Aufnahmekonstante k_1 kann dann algebraisch nach Gleichung A5.23 (Anlage 5) bestimmt werden (wobei C_f gleich C_{f1} und t gleich t_1) (1). Der kinetische Biokonzentrationsfaktor für den minimierten Versuchsplan (bezeichnet als BCF_{Km} , um ihn von den kinetischen Biokonzentrationsfaktoren zu unterscheiden, die nach anderen Methoden ermittelt werden) entspricht somit

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Gleichung A6.1]}$$

Die Konzentrationen oder Ergebnisse sollten um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum korrigiert und auf einen Lipidgehalt von 5 % standardisiert werden, wie in Anlage 5 beschrieben.

Der minimierte BCF_{SS} entspricht dem am Ende der Aufnahmephase berechneten BCF, wobei davon ausgegangen wird, dass ein stationärer Zustand erreicht wurde. Dies kann lediglich angenommen werden, da die Probenahmezeitpunkte für den entsprechenden Nachweis nicht ausreichen.

$$\text{Minimierter } BCF_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \quad \text{[Gleichung A6.2]}$$

Dabei gilt: $C_{f-minSS}$ = Konzentration in den Fischen bei angenommenem stationärem Zustand am Ende der Aufnahmephase (mg kg^{-1} Nassgewicht).

$C_{w\text{-minSS}}$ = Konzentration im Wasser bei angenommenem stationärem Zustand am Ende der Aufnahmephase (mg l^{-1}).

LITERATURHINWEISE

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.

Anlage 7

GLEICHUNGEN FÜR DIE PRÜFUNG MIT EXPOSITION ÜBER DAS FUTTER

1. Beispiel die Zusammensetzung eines geeigneten handelsüblichen Fischfutters
2. Beispiele für Futterdotierungstechniken
3. Berechnung der Assimilationseffizienz und des Biomagnifikationsfaktors
4. Lipidkorrektur
5. Bewertung der Unterschiede zwischen der gemessenen Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,m}$) und der abgeleiteten Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,d}$)
6. Empfehlungen für sehr schnell ausgeschiedene Prüfstoffe

1. **BEISPIEL DER ZUSAMMENSETZUNG EINES GEEIGNETEN HANDELSÜBLICHEN FISCHFUTTERS**

Hauptbestandteil	Fischmehl
Rohprotein	≤ 55,0 %
Rohfett	≤ 15,0 % ⁽¹⁾
Rohfaser	≥ 2,0 %
Feuchtigkeit	≥ 12%
Asche	≥ 8%

(1) In bestimmten Regionen ist möglicherweise nur Fischfutter mit einer Lipidkonzentration erhältlich, die weit unter dieser Obergrenze liegt. In solchen Fällen sollten die Versuche mit der niedrigeren Lipidkonzentration im gelieferten Futter durchgeführt und die Fütterungsrate sollte entsprechend angepasst werden, damit die Fische gesund bleiben. Der Lipidgehalt des Futters sollte nicht durch Beimischung von zu viel Öl künstlich erhöht werden.

2. BEISPIELE FÜR FUTTERDOTIERUNGSTECHNIKEN

Allgemeines

Kontrollfutter sollte exakt auf dieselbe Weise zubereitet werden wie die dotiertes Futter, nur ohne Prüfstoff.

Zur Überprüfung der Konzentration des behandelten Futters sollten nach einer geeigneten Extraktionsmethode drei Proben des dosierten Futters entnommen werden, um die Prüfstoffkonzentration oder Radioaktivität in den Extrakten zu messen. Es sollten hohe Wiederfindungsraten ($> 85\%$) mit geringer Schwankung zwischen den Proben (3 Konzentrationsproben, zu Prüfungsbeginn entnommen, sollten nicht mehr als $\pm 15\%$ vom Mittelwert abweichen) nachgewiesen werden.

Während der futterbezogenen Prüfung sollten drei Futterproben für die Analyse an Tag 0 und am Ende der Aufnahmephase entnommen werden, um den Prüfstoffgehalt im Futter zu bestimmen.

Fischfutterzubereitung mit flüssigem Versuchsmaterial (rein)

Es wird die angestrebte nominale Prüfstoffkonzentration im behandelten Fischfutter festgelegt, beispielsweise auf 500 µg Prüfstoff/g Futter. Die ungefähre Menge (nach Molmasse oder spezifischer Radioaktivität) des reinen Prüfstoffs wird einer bekannten Masse Fischfutter in einem Glasgefäß oder Rotationsverdampfer beigemischt. Diese Masse sollte für die Dauer der Aufnahmephase ausreichen (dabei ist zu berücksichtigen, dass die Mengen bei jeder Fütterung aufgrund des Fischwachstums erhöht werden müssen). Dieses Fischfutter sollte über Nacht durch sanftes Schütteln (z. B. in einem Roto-Mischer oder durch Rotation bei Verwendung eines Rotationsverdampfers) gemischt werden. Das dotierte Futter sollte unter Bedingungen gelagert werden, die die Stabilität des Prüfstoffs in der Futtermischung bis zur Verwendung garantieren (z. B. Kühlung).

Zubereitung von Fischfutter mit Maiskeim- oder Fischöl als Vehikel

Feste Prüfstoffe sollten in einem Mörser zu feinem Pulver zermahlen werden. Flüssige Prüfstoffe können dem Maiskeim- oder Fischöl direkt zugegeben werden. Der Prüfstoff wird in einer bekannten Menge Maiskeim- oder Fischöl (z. B. 5-15 ml) gelöst. Das dosierte Öl wird nach und nach in einen Rotationsverdampfer geeigneter Größe überführt. Das Gefäß zur Vorbereitung des dosierten Öls sollte mit zwei kleinen Aliquoten Öl gespült werden, die anschließend in den Verdampferkolben gegeben werden, um sicherzustellen, dass der gesamte gelöste Prüfstoff überführt wurde. Um eine vollständige Lösung/Dispersion im Öl zu gewährleisten (oder wenn im Versuch mehrere Prüfstoffe verwendet werden), werden ein Mikrorührer hinzugefügt, das Gefäß mit Stopfen verschlossen und die Mischung über Nacht schnell geschüttelt. Eine geeignete Menge Fischfutter (gewöhnlich in Pelletform) wird für die Prüfung in das den Verdampfer gegeben und der Gefäßinhalt gleichmäßig durch ständiges Rotatieren des Glasgefäßes während mindestens 30 Minuten, jedoch vorzugsweise über Nacht gemischt. Anschließend wird das dotierte Futter gelagert (z. B. gekühlt), um die Stabilität des Prüfstoffs im Futter bis seiner Verwendung zu gewährleisten.

Zubereitung von Fischfutter mit einem organischen Lösungsmittel

Eine geeignete Menge Prüfstoff (nach Molmasse oder spezifischer Radioaktivität), die für die Herstellung der Zieldosis ausreicht, wird in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst (z. B. Cyclohexan oder Aceton; 10-40 ml, ggf. auch mehr, je nach Menge des zu dotierenden Futters). Ein Aliquot oder die gesamte Menge (portionsweise hinzugefügt) dieser Lösung wird mit der für die Prüfung ausreichende Fischfuttermasse gemischt, um die erforderliche nominale Dosierung zu erhalten. Futter und Prüfstoff können in einem Mischbehälter aus Edelstahl gemischt werden. Das frisch dosierte Fischfutter kann in dem Behälter belassen und zwei Tage lang in einem Laborabzug (mit gelegentlichem Rühren) aufbewahrt werden, damit das überschüssige

Lösungsmittel verdampfen kann, oder es kann in einem kontinuierlich drehenden Rotationsverdampfer gemischt werden. Das überschüssige Lösungsmittel kann ggf. durch Luft- oder Stickstoffstrom „weggeblasen“ werden. Es sollte unbedingt sichergestellt werden, dass der Prüfstoff nicht kristallisiert, wenn das Lösungsmittel entfernt wird. Das dotierte Futter sollte unter Bedingungen (z. B. Kühlung) gelagert werden, die die Stabilität des Prüfstoffs in der Futtermischung bis seiner Verwendung gewährleisten.

3. **BERECHNUNG DER ASSIMILATIONSEFFIZIENZ UND DES BIOMAGNIFIKATIONSFAKTORS**

Zur Berechnung der Assimilationseffizienz sollte zunächst die Gesamtausscheidungskonstante gemäß Anlage 5 Abschnitt 4 (nach der „sequenziellen Methode“, d. h. mit standardmäßiger linearer Regression) geschätzt werden; dazu mittlere Konzentrationen von Proben aus der Ausscheidungsphase verwenden. Die Fütterungskonstante, I , und die Aufnahmedauer, t , sind bekannte Versuchsparameter. C_{Futter} , die mittlere gemessene Konzentration des Prüfstoffs im Futter, ist eine während der Prüfung gemessene Variable. $C_{0,d}$, die Prüfstoffkonzentration in den Fischen am Ende der Aufnahmephase, wird gewöhnlich aus dem Achsenabschnitt einer graphischen Darstellung von $\ln(\text{Konzentration})$ bezogen auf den Ausscheidungstag abgeleitet.

Die Assimilationseffizienz des Stoffes (α , Absorption des Prüfstoffs über den Darm) wird berechnet als

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{Futter}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad \text{[Gleichung A7.1]}$$

Dabei gilt:

$C_{0,d}$ = abgeleitete Konzentration in den Fischen zum Zeitpunkt Null der Ausscheidungsphase (mg kg^{-1});

k_2 = gesamte (nicht wachstumskorrigierte) Ausscheidungskonstante (Tag^{-1}), berechnet nach den Gleichungen in Anlage 5 Abschnitt 3;

I = Futteringestionskonstante ($\text{g Futter g}^{-1} \text{Fisch Tag}^{-1}$);

C_{Futter} = Konzentration im Futter ($\text{mg kg}^{-1} \text{Futter}$);

t = Dauer der Fütterungsphase (Tag)

Die für die Berechnung verwendete Fütterungsrate I muss jedoch möglicherweise um das Fischwachstum korrigiert werden, um eine exakte Assimilationseffizienz α zu

erhalten. Bei einer Prüfung, bei der die Fische während der Aufnahme­phase (in der die Futtermengen nicht korrigiert werden, um die festgelegte Fütterungsrate einzuhalten) erheblich wachsen, ist die tatsächliche effektive Fütterungsrate mit fortschreitender Aufnahme­phase geringer als die vorgegebene Fütterungsrate, was zu einer höheren „realen“ Assimilationseffizienz führt. (Dieser Aspekt ist für die Gesamtberechnung des BMF nicht wichtig, da die I -Terme zwischen den Gleichungen A7.1 und A7.4 aufgehoben werden). Die um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum korrigierte mittlere Fütterungsrate I_g kann auf verschiedene Weise abgeleitet werden; eine einfache und robuste Methode besteht jedoch darin, die Gewichte der Versuchsfische zu bestimmten Zeitpunkten während der Aufnahme­phase anhand der bekannten Wachstumskonstanten (k_g) zu schätzen, d. h.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \quad \text{[Gleichung A7.2]}$$

Dabei gilt:

$W_f(t)$ = mittleres Fischgewicht am Aufnahmetag t

$W_{f,0}$ = mittleres Fischgewicht zu Beginn des Versuchs

Auf diese Weise kann (zumindest) das mittlere Fischgewicht am letzten Expositionstag ($W_{f,\text{Aufnahmeende}}$) geschätzt werden. Da die Fütterungsrate auf Basis von $W_{f,0}$ festgelegt wurde, kann die tatsächliche Fütterungsrate für jeden Tag der Aufnahme anhand dieser beiden Gewichtswerte berechnet werden. Die wachstumskorrigierte Fütterungsrate I_g ($\text{g Futter}^{-1} \text{ Fisch Tag}^{-1}$), die anstelle von I bei schnellem Wachstum während der Aufnahme­phase zu verwenden ist, kann dann wie folgt berechnet werden:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{Ende der Aufnahme}}} \quad \text{[Gleichung A7.3]}$$

Nach Bestimmung der Assimilationseffizienz kann der BMF durch Multiplikation mit der Fütterungskonstanten I (oder I_g , falls zur Berechnung von α herangezogen) und Division des Produkts durch die Gesamtausscheidungskonstante k_2 berechnet werden:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad \text{[Gleichung A7.4]}$$

Der wachstumskorrigierte Biomagnifikationsfaktor sollte auf dieselbe Weise berechnet werden, jedoch anhand der wachstumskorrigierten Ausscheidungskonstanten (wie gemäß Anlage 5 Abschnitt 7 abgeleitet). Wenn hingegen I_g zur Berechnung von α herangezogen wurde, sollte sie auch hier anstelle von I verwendet werden:

$$BMF = \frac{I_g \times \alpha}{k_{2g}} \quad \text{[Gleichung A7.5]}$$

Dabei gilt:

α = Assimilationseffizienz (Absorption des Prüfstoff über den Darm);

k_2 = gesamte (nicht wachstumskorrigierte) Ausscheidungskonstante (Tag^{-1}), berechnet anhand der Gleichungen in Abschnitt 3 von Anlage 5;

k_{2g} = wachstumskorrigierte Ausscheidungskonstante (Tag^{-1});

I = Futteringestionskonstante ($\text{g Futter g}^{-1} \text{Fisch Tag}^{-1}$);

Die wachstumskorrigierte Halbwertszeit ($t_{1/2}$) wird wie folgt berechnet:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad \text{[Gleichung A7.6]}$$

Die Assimilationseffizienz des Stoffes in der Nahrung kann auch geschätzt werden, wenn während der linearen Phase der Aufnahmephase (zwischen Tag 1 und 3) die Geweberückstände bestimmt werden. In diesem Fall kann die stoffspezifische Assimilationseffizienz (α) wie folgt berechnet werden:

$$\alpha = \frac{C_{\text{Fisch}}(t)}{I \times C_{\text{Futter}} \times t} \quad \text{[Gleichung A7.7]}$$

Dabei gilt:

$C_{\text{Fisch}}(t)$ = Konzentration des Prüfstoffs in den Fischen zum Zeitpunkt t (mg kg^{-1} Nassgewicht).

4. KORREKTUR UM DEN LIPIDGEHALT

Wurde der Lipidgehalt zu jedem Probenahmezeitpunkt an denselben Fischen gemessen, die auch chemisch analysiert wurden, sollten die einzelnen Konzentrationen um den Lipidgehalt korrigiert und $\ln(\text{Konzentration, lipidkorrigiert})$ sollte gegen die Ausscheidung (Tag) aufgetragen werden, um $C_{0,d}$ und k_2 zu erhalten. Die Assimilationseffizienz (Gleichung A7.1) kann sodann auf Lipidbasis unter Verwendung von C_{Futter} berechnet werden (*d. h.* C_{Futter} wird mit der mittleren Lipidfraktion des Futters multipliziert). Durch anschließende Berechnung nach der Gleichungen A7.4 und A7.5 lässt sich der lipidkorrigierte (und um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum korrigierte) BMF direkt ermittelt.

Andernfalls wird die mittlere Lipidfraktion (w/w) in den Fischen und im Futter sowohl für die Prüf- als auch für die Kontrollgruppe abgeleitet (für das Futter und die Fische

der Kontrollgruppe geschieht dies in der Regel anhand der zu Expositionsbeginn und -ende gemessenen Daten, für die Fische aus der Prüfgruppe nur anhand der am Expositionsende gemessenen Daten). Bei bestimmten Versuchen kann der Lipidgehalt der Fische stark ansteigen; in solchen Fällen sollte eine mittlere Konzentration der Prüffischlipide zugrunde gelegt werden, die aus den Messwerten am Ende der Exposition sowie am Ende der Ausscheidung errechnet wurde. Die Daten der Prüfgruppe dienen in der Regeln nur für die Ableitung beider Lipidfraktionen.

Der Lipidkorrekturfaktor (L_c) wird wie folgt berechnet:

$$L_c = \frac{L_{Fisch}}{L_{Futter}} \quad \text{[Gleichung A7.8]}$$

Dabei sind:

L_{Fisch} und L_{Futter} die mittleren Lipidfraktionen in den Fischen bzw. im Futter.

Anhand des Lipidkorrekturfaktors wird der lipidkorrigierte Biomagnifikationsfaktor (BMF_L) wie folgt berechnet:

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad \text{[Gleichung A7.9]}$$

5. BEWERTUNG DER UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER GEMESSENEN KONZENTRATION ZUM ZEITPUNKT NULL ($C_{0,m}$) UND DER ABGELEITETEN KONZENTRATION ZUM ZEITPUNKT NULL ($C_{0,d}$)

Die gemessene Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,m}$) und die abgeleitete Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,d}$) sollten miteinander verglichen werden. Sind diese Konzentrationen sehr ähnlich, empfiehlt es sich, das Modell erster Ordnung für die Ableitung der Ausscheidungsparameter zu verwenden.

Bei bestimmten Versuchen kann eine erhebliche Differenz zwischen der abgeleiteten Konzentration zum Zeitpunkt Null, $C_{0,d}$, und der mittleren gemessenen Konzentration zum Zeitpunkt Null, $C_{0,m}$ (siehe letzter Spiegelstrich unter Nummer 159 dieser Prüfmethode), auftreten. Ist $C_{0,d}$ wesentlich geringer als $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), kann die Differenz auf das Vorhandensein von unverdaulichem dotiertem Futter im Darm hindeuten. Dies kann experimentell untersucht werden, indem der entfernte Darm separat analysiert wird, soweit am Ende der Aufnahmephase zusätzliche Proben (Ganzfische) entnommen und gelagert wurden. Sollte ein statistisch gültiger Ausreißertest, der auf die lineare Regression der Ausscheidungsphase angewandt wird, jedoch darauf hindeuten, dass die Konzentration am ersten Probenahmezeitpunkt in der Ausscheidungsphase unangemessen hoch ist, empfiehlt es sich eventuell, die lineare Regression zur Ableitung von k_2 durchzuführen, die erste Konzentration der Ausscheidungsphase jedoch auszulassen. In solchen Fällen, wenn die Unsicherheit in

der linearen Regression stark verringert und klar ist, dass die Ausscheidungskinetik erster Ordnung ungefähr befolgt wurde, empfiehlt es sich möglicherweise, die $C_{0,d}$ - und k_2 -Werte aus der Berechnung der Assimilationseffizienz heranzuziehen. Dies sollte im Bericht umfassend begründet werden. Es kann auch vorkommen, dass die Ausscheidungsphase nicht einer Kinetik erster Ordnung folgt. Ist davon auszugehen (*d. h.* scheinen die durch natürliches Logarithmieren transformierten Daten im Vergleich zur linearen Regressionsgeraden einer Kurve zu folgen), sind die Berechnungen von k_2 und $C_{0,d}$ wahrscheinlich ungültig. In diesem Fall sollte der Rat eines Biostatistikers eingeholt werden.

Liegt $C_{0,d}$ erheblich über dem Messwert ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), kann dies darauf hindeuten, dass der Stoff sehr schnell ausgeschieden wurde (*d. h.* die Probenahmezeitpunkte erreichen die Quantifizierungsgrenze der Analyseverfahren während der Ausscheidungsphase sehr schnell, *vgl.* Abschnitt 6), dass der Ausscheidungsprozess nicht der Kinetik erster Ordnung folgte, dass die lineare Regression für die Ableitung von k_2 und $C_{0,d}$ mangelhaft ist oder dass zu bestimmten Probenahmezeitpunkten ein Problem mit den gemessenen Konzentrationen aufgetreten ist. In solchen Fällen sollte die lineare Regressionskurve auf Hinweise auf Proben an oder in der Nähe der Quantifizierungsgrenze, auf Ausreißer und auf eine eindeutige Kurvenform (die das Nichtvorliegen einer Kinetik erster Ordnung belegt) untersucht werden, was im Bericht anzugeben ist. Eine anschließende Neubewertung der linearen Regression zur Verbesserung der Schätzwerte sollte beschrieben und begründet werden. Wird eine markante Abweichung von der Kinetik erster Ordnung festgestellt, sind die Berechnungen von k_2 und $C_{0,d}$ wahrscheinlich ungültig, und es sollte der Rat eines Biostatistikers eingeholt werden.

6. EMPFEHLUNGEN FÜR SEHR SCHNELL AUSGESCHIEDENE PRÜFSTOFFE

Wie unter Nummer 129 der Prüfmethode beschrieben, werden bestimmte Prüfstoffe so schnell ausgeschieden, dass eine zuverlässige Konzentration zum Zeitpunkt Null $C_{0,d}$ und k_2 nicht abgeleitet werden können, da der Prüfstoff in Proben, die zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Ausscheidungsphase (*d. h.* ab der zweiten Ausscheidungsprobe) entnommen werden, effektiv nicht mehr gemessen werden kann (Konzentrationen an der Quantifizierungsgrenze). Diese Situation wurde in dem Ringtest beobachtet, der zur Unterstützung dieser Prüfmethode mit Benzo[a]pyren durchgeführt wurde, und im Validierungsbericht für die Methode dokumentiert. In solchen Fällen kann eine lineare Regression nicht zuverlässig durchgeführt werden und führt wahrscheinlich zu einer unrealistisch hohen Schätzung von $C_{0,d}$ und letztlich zu augenscheinlichen Assimilationseffizienzen, die wesentlich größer als 1 ist. In diesem Fall ist es möglich, k_2 konservativ zu schätzen und den BMF „nach oben“ anzusetzen.

Bei Verwendung dieser Datenpunkte der Ausscheidungsphase, an denen eine Konzentration gemessen wurde, einschließlich der ersten nicht „nachweisbaren“ Konzentration (Konzentration an der Quantifizierungsgrenze), ergibt eine lineare

Regression (auf Basis der durch natürliches Logarithmieren transformierten Konzentrationsdaten im Verhältnis zur Zeit) einen Schätzwert für k_2 . Dazu sind oft nur zwei Datenpunkte (z. B. Probenahmetage 1 und 2 der Ausscheidung) erforderlich, weshalb k_2 alsdann nach der Gleichung A5.22 in Anlage 5 geschätzt werden. Auf Basis auf dieses Schätzwertes für k_2 kann mit Gleichung A7.1 eine Assimilationseffizienz geschätzt werden, indem in dieser Gleichung der Wert $C_{0,d}$ durch die gemessene Konzentration zum Zeitpunkt Null ($C_{0,m}$) ersetzt wird, wenn nach Schätzungen $C_{0,d}$ wesentlich über dem Wert liegt, der im Test hätte erreicht werden können. War $C_{0,m}$ nicht messbar, sollte die Nachweisgrenze im Fischgewebe verwendet werden. Wenn dies in bestimmten Fällen einen Wert $\alpha > 1$ ergibt, gilt eine Assimilationseffizienz von 1 als *Worst Case*.

Der maximale BMF_K kann dann nach der Gleichung A7.4 geschätzt werden und sollte als Wert „wesentlich kleiner als“ (\ll) angegeben werden. Bei einem Versuch, der mit einer Fütterungsrate von 3 % und einer Ausscheidungshalbwertszeit von weniger als 3 Tagen und einem *Worst Case*- α von 1 durchgeführt wurde, ist von einem BMF_K von unter ungefähr 0,13 auszugehen. Angesichts des Gegenstands dieser Schätzung und der Tatsache, dass die Werte konservativer Art sind, müssen sie nicht um den Effekt der Verdünnung durch Wachstum oder den Lipidgehalt der Fische bzw. des Futters korrigiert werden.

Anlage 8

ANSÄTZE ZUR SCHÄTZUNG VORLÄUFIGER BCF-WERTE ANHAND VON DATEN AUS DEM VERSUCH MIT EXPOSITION ÜBER DAS FUTTER

Die Methode mit Exposition über das Futter ist Teil der vorliegenden Prüfmethode für die Bioakkumulationsprüfung an Stoffen, die in der Praxis nicht nach der Methode mit aquatischer Exposition geprüft werden können. Die Methode mit aquatischer Exposition ergibt einen Biokonzentrationsfaktor, während die Methode mit Exposition über das Futter direkt Informationen über das Biomagnifikationspotenzial des Futters liefert. Viele Regelungen für Chemikaliensicherheit erfordern Informationen über die aquatischen Biokonzentration (so die Risikobewertung und das Globale Harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien, GHS). Deshalb müssen die Daten aus einem Versuch mit Exposition über das Futter verwendet werden, um einen Biokonzentrationsfaktor zu schätzen, der sich mit Tests vergleichen lässt, die nach der Methode mit aquatischer Exposition durchgeführt wurden⁽¹⁾. In diesem Abschnitt werden Ansätze in dieser Richtung geprüft, ohne jedoch die mit diesen Schätzungen einhergehenden Mängel außer Acht zu lassen.

Beim Versuch mit Exposition über das Futter wird die Ausscheidung gemessen, um eine Ausscheidungskonstante k_2 zu bestimmen. Kann anhand der verfügbaren Daten eine Aufnahmekonstante geschätzt werden, wenn der Fisch dem Prüfstoff über das Wasser ausgesetzt wurde, dann kann auch ein kinetischer BCF geschätzt werden.

Die Schätzung einer Aufnahmekonstanten für die Exposition gegenüber eines Prüfstoffs über das Wasser beruht auf zahlreichen Annahmen, die alle zur Unsicherheit der Schätzung beitragen. Zudem setzt dieser Ansatz für die Schätzung des BCF voraus, dass die Gesamtausscheidungsrate (einschließlich Einflussfaktoren wie die Verteilung im Körper und individuelle Ausscheidungsprozesse) von der Expositionsmethode, nach der die prüfstoffbedingte Körperbelastung bestimmt wird, unabhängig ist.

Die wichtigsten Hypothesen dieses Schätzungsansatzes lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Ausscheidung während der Futteraufnahme ist bei einem gegebenen Prüfstoff mit der Ausscheidung nach einer Exposition über das Wasser identisch.

(1) In freier Wildbahn ist Ingestion wahrscheinlich der beste Weg, um Fische in aquatischem Milieu stark hydrophoben Stoffen auszusetzen, weshalb ein geschätzter BCF für das Bioakkumulationspotenzial eines solchen Stoffs nicht unbedingt repräsentativ ist.

Die Aufnahme über das Wasser folgt einer Kinetik erster Ordnung.

Je nach Methode, nach der die Aufnahme geschätzt wird, gilt Folgendes:

- Die Aufnahme kann nur mit dem Fischgewicht korreliert werden.
- Die Aufnahme kann nur mit dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten des Prüfstoﬀs korreliert werden.
- Die Aufnahme kann mit einer Kombination aus Fischgewicht und dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten des Prüfstoﬀs korreliert werden.
- Faktoren, die sich im praktischen Versuch auf die Aufnahme mit aquatischer Exposition auswirken können, wie z. B. Bioverfügbarkeit, Adsorption an der Apparatur, Molekulargröße usw., haben eine geringe Wirkung.
- und insbesondere:

die Datenbank für die Entwicklung der Methode für die Schätzung der Aufnahme ist für den untersuchten Prüfstoﬀ repräsentativ.

Verschiedene Publikationen in der frei verfügbaren Fachliteratur enthalten abgeleitete Gleichungen, in denen die Aufnahme aus dem Wasser über die Kiemen zum Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten des Prüfstoﬀs, zum Fischgewicht (1) (2) (3) (4), zum Volumen und/oder Lipidgehalt, zur Membranpermeation/-diffusion (5) (6), zum Fischatmungsvolumen (7) und zu einem Fugazitäts-/Massenbilanzansatz (8) (9) (10) in Bezug gesetzt wird. Eine ausführliche Bewertung solcher Methoden in diesem Kontext ist Crookes & Brooke (11) zu entnehmen. Eine Veröffentlichung von Barber (12) die sich auf die Modellierung der Bioakkumulation durch Aufnahme über das Futter konzentriert, ist in diesem Zusammenhang ebenfalls hilfreich, da sie Beiträge aus Modellen für die Kinetik der Aufnahme über die Kiemen beinhaltet. Ein Abschnitt des Hintergrunddokuments zum *Dietary Protocol* 2004 (13) ist ebenfalls diesem Aspekt gewidmet.

Die meisten dieser Modelle scheinen aus begrenzten Datenbanken abgeleitet worden zu sein. Bei Modellen, für die die Datenbanken, auf denen das Modell beruht, verfügbar sind, scheinen die verwendeten Stoffarten häufig von ähnlicher Struktur oder Klasse zu sein (bezogen auf die Funktionalität, z. B. Organchloride). Neben den prüfungsspezifischen Aspekten wie Spezies, Temperatur usw. erhöht dies die mit einem Modell zur Vorhersage einer Aufnahmekonstanten für eine Prüfstoﬀart einhergehende Unsicherheit noch zusätzlich.

Eine Überprüfung der verfügbaren Methoden (11) ergab, dass keine Methode „richtiger“ ist als die anderen. Daher sollte das verwendete Modell genau begründet werden. Existieren verschiedene Methoden, deren Anwendung gerechtfertigt werden kann, kann es ratsam sein, mehrere Schätzwerte für k_1 (und den BCF) oder einen Wertebereich von k_1 (und BCF) anzugeben, die nach den Methoden für die Schätzung der Aufnahme berechnet wurden. Angesichts der Unterschiede bei den Modelltypen und Datensätzen, die zur Entwicklung

dieser Methoden verwendet wurden, wäre die Akzeptanz eines Mittelwerts aus auf verschiedene Weise abgeleiteten Schätzungen jedoch unangemessen.

Einige Wissenschaftler haben gefordert, diese BCF-Schätzungen um die Bioverfügbarkeit zu korrigieren, um die Adsorption des Prüfstoffs an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) unter aquatischen Expositionsbedingungen zu berücksichtigen, damit die Schätzung mit den Ergebnissen aus Versuchen mit aquatischer Exposition im Einklang steht (z. B. (13) (14)). Jedoch ist diese Korrektur angesichts der niedrigen DOC-Niveaus, die in einer Studie mit aquatischer Exposition für eine *Worst-Case*-Schätzung erforderlich sind (d. h. Verhältnis des bioverfügbaren Prüfstoffs zum Prüfstoff, wie in der Lösung gemessen) eventuell nicht zweckmäßig. Bei stark hydrophoben Substanzen kann die Aufnahme über die Kiemen durch die Rate der passiven Diffusion nahe der Kiemenoberfläche eingeschränkt sein; in diesem Fall wird dieser Effekt bei der Korrektur möglicherweise stärker berücksichtigt als der ursprünglich vorgesehene Effekt.

Es empfiehlt sich, den Schwerpunkt auf Methoden zu legen, die Inputs erfordern, für die die Daten über Stoffe, die nach der hier beschriebenen Methode mit Exposition über das Futter geprüft wurden (d. h. $\log K_{OW}$, Fischgewicht), problemlos verfügbar sind. Andere Methoden, die komplexere Inputs erfordern, können angewandt werden, doch sind eventuell zusätzliche Messungen im Test oder detaillierte Kenntnisse des Prüfstoffs oder der Fischart erforderlich, die nicht allgemein verfügbar sind. Zudem kann die Wahl des Modells durch das Niveau der Validierung und den Anwendungsbereich beeinflusst werden (siehe (11) bezüglich Überprüfung und Vergleich verschiedener Methoden).

Es ist zu beachten, dass die resultierenden Schätzwerte für k_1 und BCF unsicher sind und bei einem evidenzbasierten Bewertungsansatz zusammen mit dem abgeleiteten BMF und den Stoffparametern (z. B. Molekulargröße) ausgewertet werden müssen, um ein Gesamtbild des Bioakkumulationspotenzials eines Prüfstoffs zu erhalten. Die Interpretation und Verwendung dieser Parameter kann vom Rechtsrahmen abhängig sein.

Literaturhinweise

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.
- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, VK.

- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231."

(17) In Teil C erhält Kapitel C.20 folgende Fassung:

„C.20 *Daphnia magna*-Reproduktionstest

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 211 (2012). Die OECD-Prüfrichtlinien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die Prüfrichtlinie 211 für Reproduktionstests basiert auf der Prüfrichtlinie 202, Teil II, *Daphnia* sp.-Reproduktionstest (1984). Es wurde allgemein anerkannt, dass die Daten aus Prüfungen gemäß der Prüfrichtlinie 202 variieren könnten. Daher wurde mit Nachdruck an der Aufdeckung der Gründe für diese Variabilität gearbeitet mit dem Ziel, eine bessere Prüfmethode zu entwickeln. Die Prüfrichtlinie 211 basiert auf den Ergebnissen dieser Forschungsaktivitäten, Ringversuche und Validierungsstudien, die 1992 (1), 1994 (2) und 2008 (3) durchgeführt wurden.
2. Die wichtigsten Unterschiede zwischen der anfänglichen Fassung (TG 202, 1984) und der zweiten Fassung (TG 211, 1998) der Prüfrichtlinie sind:
 - Die empfohlene Tierart ist *Daphnia magna*.
 - Die Prüfung dauert 21 Tage.
 - Bei semistatischen Prüfungen wurde die Anzahl der bei jeder Prüfkonzentration zu verwendenden Tiere von mindestens 40, die in vier Gruppen von jeweils zehn Tieren aufzuteilen waren, auf mindestens zehn einzeln gehaltene Tiere verringert (obwohl bei Durchflussprüfungen andere Versuchspläne verwendet werden können).
 - Die Empfehlungen zum Prüfmedium und zu den Fütterungsbedingungen wurden präzisiert.
 - Die wichtigsten Unterschiede zwischen der zweiten Fassung der Prüfrichtlinie (TG 211, 1998) und der vorliegenden Fassung sind:
 - Anlage 7 mit Verfahren zur Geschlechtsbestimmung bei frisch geschlüpften Daphnien, sofern erforderlich, wurde hinzugefügt. Wie bei den vorherigen Fassungen dieser Prüfmethode ist das Geschlechterverhältnis ein fakultativer Endpunkt.
 - Die Reaktionsvariable „Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro lebendem Elterntier produziert werden“ wurde durch eine zusätzliche Reaktionsvariable für die Reproduktion von Daphnien ergänzt, d. h. die Gesamtanzahl der am Ende der Prüfung produzierten lebenden Nachkommen von zu Beginn der Prüfung vorhandenen Elterntieren, wobei versehentlich und/oder aus ungeklärter Ursache gestorbene Elterntiere aus der Analyse ausgeschlossen wird. Diese zusätzliche Reaktionsvariable wurde aufgenommen, um diesen Parameter mit anderen Methoden zur Prüfung der Reproduktion bei Wirbellosen in Einklang zu bringen. Außerdem erlaubt diese Prüfmethode die Eliminierung einer Fehlerquelle bei dieser Reaktionsvariablen, nämlich den Effekt der versehentlich gestorbenen Elterntiere und/oder ihrer Mortalität aus ungeklärter Ursache, falls diese während des Expositionszeitraums auftreten sollte.

-Zusätzliche statistische Leitlinien für den Versuchsplan sowie für die Auswertung der Ergebnisse wurden sowohl für den ECx- (z. B. EC10 oder EC50) als auch für den NOEC/LOEC-Ansatz aufgenommen.

-Ein Limit-Test wird eingeführt.

3. Die Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

TESTPRINZIP

4. Hauptziel der Prüfung ist es, die Wirkung von Chemikalien auf die Reproduktionsleistung der *Daphnia magna* zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden junge weibliche Daphnien (die Elterntiere), die zu Beginn der Prüfung weniger als 24 Stunden alt sind, dem Wasser in verschiedenen Konzentrationen zugesetzter Prüfchemikalie ausgesetzt. Die Prüfung dauert 21 Tage. Am Ende der Prüfung wird die Gesamtzahl an lebenden Nachkommen bewertet. Die Reproduktionsleistung von Elterntieren kann auch auf andere Art und Weise angegeben werden (z. B. Anzahl an lebenden Nachkommen, die je Tier und Tag ab dem ersten Tag, an dem Nachkommen festgestellt wurden, produziert wurden), diese Angaben sollten jedoch zusätzlich zur Gesamtzahl an Jungtieren protokolliert werden. Aufgrund des besonderen Versuchsaufbaus der semistatistischen Prüfung im Vergleich zu anderen Methoden zur Prüfung der Reproduktion bei Wirbellosen kann auch die Anzahl der von jedem einzelnen Elterntier produzierten lebenden Nachkommen gezählt werden. Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Prüfung der Reproduktion bei Wirbellosen kann daher die Produktion von Nachkommen aus der Datenbewertung ausgeschlossen werden, falls das Elterntier während des Prüfzeitraums versehentlich und/oder aus ungeklärter Ursache stirbt. Tritt die elterliche Mortalität bei exponierten Replikaten auf, sollte daher geprüft werden, ob die Mortalität einem Konzentrations-/Wirkungs-Muster folgt, z. B. ob eine signifikante Regression der Reaktion im Verhältnis zur Konzentration der Prüfchemikalie mit positiver Steigung vorliegt (hierzu kann ein statistischer Test wie der Cochran-Armitage-Trendtest angewandt werden). Folgt die Mortalität keinem Konzentrations-/Wirkungs-Muster, dann sollten diejenigen Replikate mit elterlicher Mortalität aus der Analyse des Testergebnisses ausgeschlossen werden. Folgt die Mortalität hingegen einem Konzentrations-/Wirkungs-Muster, sollte die elterliche Mortalität als Wirkung der Prüfchemikalie eingeordnet und die Replikate sollten nicht aus der Analyse ausgeschlossen werden. Wenn das Elterntier während der Prüfung stirbt, d. h. versehentlich wegen falscher Behandlung oder eines Unfalls oder aber zufällig aufgrund eines ungeklärten Vorfalls, der nicht mit der Wirkung der Prüfchemikalie in Verbindung steht, oder wenn das Elterntier sich als männlich erweist, wird das Replikat aus der Analyse ausgeschlossen (nähere Angaben unter Nummer 51). Die toxische Wirkung der Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung wird als EC_x angegeben, wobei die Daten durch nichtlineare Regression an ein geeignetes Modell angepasst werden, um die Konzentration zu schätzen, die zu einer x%igen Verringerung der Reproduktionsleistung führen würde, oder als NOEC/LOEC-Wert angegeben (4). Die Prüfkonzentrationen sollten vorzugsweise die niedrigste der verwendeten

Wirkungskonzentrationen (z. B. EC₁₀) einschließen, was bedeutet, dass dieser Wert durch Interpolation und nicht durch Extrapolation berechnet wird.

5. Das Überleben der Elterntiere und die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut sollten ebenfalls angegeben werden. Andere Wirkungen der Chemikalie auf Parameter wie das Wachstum (z. B. die Länge) und eine mögliche immanente Wachstumsrate können ebenfalls untersucht werden (siehe Nummer 44).

ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

6. Die Ergebnisse einer akuten Toxizitätsprüfung (siehe Kapitel C.2: *Daphnia* sp.-Test auf akute Schwimmfähigkeit), die an *Daphnia magna* durchgeführt wurden, können bei der Auswahl eines geeigneten Bereichs der Prüfkonzentrationen in den Reproduktionstests von Nutzen sein. Die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck der Prüfchemikalie sollten bekannt sein, und ein zuverlässiges Analyseverfahren für die Quantifizierung der Prüfchemikalie in den Prüflösungen mit dokumentierter Wiederfindungsrate und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein.
7. Zu den Informationen über die Prüfchemikalie, die bei der Festlegung der Prüfbedingungen von Nutzen sein können, gehören die Strukturformel, die Reinheit der Chemikalie, die Lichtstabilität, die Stabilität unter den Versuchsbedingungen, pKa, P_{ow} und die Ergebnisse einer Prüfung zur leichten biologischen Abbaubarkeit (siehe Kapitel C.4 (Biologische Abbaubarkeit - Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit) und C.29 (Leichte biologische Abbaubarkeit – Bestimmung von CO₂ in geschlossenen Flaschen (Head-Space-Test))).

VALIDITÄTSKRITERIEN

8. Damit die Validität einer Prüfung gegeben ist, sollten die folgenden Leistungskriterien in der/den Kontrolle(n) erfüllt werden:
- Die Mortalität der Elterntiere (weibliche Daphnien) darf am Ende der Prüfung 20 % nicht übersteigen;
 - die mittlere Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier produziert wurden, ist ≥ 60 .

Hinweis: Dasselbe Validitätskriterium (20 %) kann auf die auf ein Versehen oder auf ungeklärte Ursachen zurückzuführende Mortalität der Elterntiere bei den Kontrollen sowie den einzelnen Prüfkonzentrationen angewandt werden.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Geräte

9. Prüfgefäße und sonstige Geräte, die mit den Prüflösungen in Berührung kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material bestehen. Normalerweise handelt es sich bei den Prüfgefäßen um Glaskolben.

10. Zusätzlich sind einige oder alle der folgenden Geräte erforderlich:

- Sauerstoffmessgerät (mit einer Mikroelektrode oder einem anderen geeigneten Gerät zur Messung von gelöstem Sauerstoff in Proben von geringem Volumen);
- geeignetes Gerät zur Regelung der Temperatur;
- pH-Messgerät;
- Gerät zur Bestimmung der Wasserhärte;
- Gerät zur Bestimmung der gesamten organischen Kohlenstoffkonzentration (TOC) von Wasser oder Gerät zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (COD);
- geeignetes Gerät zur Regelung der Beleuchtungsverhältnisse und zur Messung der Lichtstärke.

Prüforganismen

11. In der Prüfung sollte die Art *Daphnia magna* Straus verwendet werden¹.

12. Der Klon sollte möglichst durch eine Genotypbestimmung identifiziert worden sein. Untersuchungen (1) haben gezeigt, dass die Reproduktionsleistung von Klon A (der aus dem IRCHA in Frankreich stammt) (5) das Validitätskriterium eines Mittelwerts von ≥ 60 Nachkommen je überlebendem Elterntier gleichbleibend erfüllt, wenn die Kultur unter den in dieser Methode beschriebenen Bedingungen erfolgt. Andere Klone sind jedoch annehmbar, sofern nachgewiesen ist, dass die Daphnien-Kultur die Validitätskriterien für eine Prüfung erfüllt.

13. Zu Beginn der Prüfung sollten die Tiere weniger als 24 Stunden alt sein, und sie dürfen nicht zur ersten Nachkommengeneration gehören. Sie sollten aus einem gesunden Bestand stammen (d. h. keine Anzeichen von Stress, wie z. B. eine hohe Mortalität, das Vorhandensein von männlichen Tieren oder Ehippien, eine verzögerte Produktion der ersten Brut, verfärbte Tiere usw.

1) Andere Daphnien-Arten können zum Einsatz kommen, sofern sie die Validitätskriterien, soweit zutreffend, erfüllen (die Validitätskriterien hinsichtlich der Reproduktionsleistung in den Kontrollen sollten für *alle* Arten relevant sein). Werden andere Daphnien-Arten verwendet, müssen diese eindeutig identifiziert werden, außerdem ist ihre Verwendung zu begründen.

aufweisen). Die Zuchttiere müssen unter ähnlichen Kulturbedingungen (Licht, Temperatur, Medium, Fütterung und Tiere je Volumeneinheit) gehalten werden wie die Tiere, die in der Prüfung verwendet werden. Wird bei der Prüfung ein anderes Kulturmedium für die Daphnien verwendet als bei der routinemäßigen Daphnien-Kultur, empfiehlt sich eine Eingewöhnungszeit vor der Prüfung, die im Normalfall etwa drei Wochen dauert (d. h. eine Generation), um Stress für die Elterntiere zu vermeiden.

Prüfmedium

14. In dieser Prüfung wird der Einsatz eines vollständig definierten Mediums empfohlen. Dadurch kann die Verwendung von Additiven (z. B. Seetang, Bodenextrakt, usw.), die sich nur schwer charakterisieren lassen, vermieden werden, und es bestehen größere Chancen auf eine Standardisierung unter den Prüfeinrichtungen. Die Medien Elendt M4 (6) und M7 (siehe Anlage 2) haben sich für diesen Zweck als geeignet erwiesen. Allerdings sind andere Medien (z. B. (7) (8)) annehmbar, sofern nachgewiesen ist, dass die Leistung der Daphnien-Kultur die Validitätskriterien für die Prüfung erfüllt.
15. Werden Medien verwendet, die undefinierte Additive enthalten, sollten diese Additive klar und deutlich spezifiziert werden, und der Prüfbericht sollte Angaben zur Zusammensetzung enthalten, insbesondere im Hinblick auf den Kohlenstoffgehalt, da dieser zu der gebotenen Nahrung beitragen kann. Empfohlen wird, dass der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) und/oder der chemische Sauerstoffbedarf (COD) des Stammsatzes des organischen Additivs bestimmt und eine Schätzung des sich daraus ergebenden Beitrags zu dem TOC/COD im Prüfmedium vorgenommen werden. Laut der Empfehlung sollten die TOC-Anteile in dem Medium (d. h. vor dem Zusatz von Algen) unter 2 mg/l liegen (9).
16. Enthalten die Prüfchemikalien Metalle, ist zu berücksichtigen, dass die Eigenschaften des Prüfmediums (z. B. Härte, Chelatbildungsvermögen) Einfluss auf die Toxizität der Prüfchemikalie haben können. Aus diesem Grund sollte möglichst ein umfassend definiertes Prüfmedium verwendet werden. Gegenwärtig sind jedoch die einzigen umfassend definierten Medien, die bekanntermaßen für die Langzeitkultur von *Daphnia magna* geeignet sind, Elendt M4 und M7. Beide Medien enthalten den Chelatbildner EDTA. Untersuchungen haben gezeigt (2), dass die „scheinbare Toxizität“ von Cadmium im Allgemeinen niedriger ist, wenn der Reproduktionstest in den Medien M4 und M7 durchgeführt wird, als in Medien, die kein EDTA enthalten. M4 und M7 werden aus diesem Grunde nicht für Prüfchemikalien empfohlen, die Metalle enthalten; andere Medien, die bekannte Chelatbildner enthalten, sollten ebenfalls vermieden werden. Bei Chemikalien, die Metall enthalten, kann die Verwendung eines alternativen Mediums ratsam sein, beispielsweise rekonstituiertes hartes Süßwasser (9) nach ASTM, das kein EDTA enthält. Die Kombination von rekonstituiertem hartem Süßwasser nach ASTM und Seetangextrakt (10) ist für die Langzeitkultur von *Daphnia magna* (2) geeignet.
17. Zu Beginn und im Verlauf der Prüfung sollte die Konzentration des gelösten Sauerstoffs über 3 mg/l liegen. Der pH-Wert sollte im Bereich von 6 bis 9 liegen und in jedem einzelnen Test um

nicht mehr als 1,5 Einheiten schwanken. Eine Härte von mehr als 140 mg/l (als CaCO₃) wird empfohlen. Bei Prüfungen mit diesem und höheren Werten wurde eine Reproduktionsleistung im Einklang mit den Validitätskriterien nachgewiesen (11) (12).

Prüflösungen

18. Prüflösungen der gewählten Konzentrationen werden im Allgemeinen durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt. Stammlösungen sollten möglichst ohne Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln durch mechanisches Vermischen oder Schütteln (z. B. durch Schütteln, durch Rühren oder mit Ultraschall oder anderen geeigneten Methoden) der Prüfchemikalie im Prüfmedium hergestellt werden. Die Versuchssysteme sollten den in der Studie zu verwendenden Konzentrationen der Prüfchemikalie vorzugsweise so lange ausgesetzt werden, dass die Aufrechterhaltung stabiler Expositionskonzentrationen nachgewiesen werden kann, bevor Prüforganismen eingesetzt werden. Ist die Prüfchemikalie nur schwer in Wasser löslich, sollten die im *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* beschriebenen Verfahren befolgt werden (13). Die Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln sollte vermieden werden, kann jedoch in einigen Fällen notwendig sein, um eine Stammlösung mit geeigneter Konzentration für die Dosierung herzustellen.
19. Zusätzlich zu den Prüfkonzentrationen sollten eine Verdünnungswasserkontrolle mit entsprechenden Replikaten und, falls unvermeidbar, eine Lösungsmittelkontrolle mit entsprechenden Replikaten durchgeführt werden. Bei der Prüfung sollten nur Lösungs- oder Dispergiermittel verwendet werden, die untersucht wurden und nachweislich keine signifikanten oder nur minimale Wirkungen auf die Reaktionsvariable haben. Beispiele für geeignete Lösungsmittel (z. B. Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylformamid und Triethylenglycol) sowie für Dispergiermittel (z. B. Cremophor RH40, Methylcellulose 0,01 % und HCO-40) sind (13) zu entnehmen. Bei Verwendung eines Lösungs- oder Dispergiermittels sollte seine Endkonzentration nicht größer als 0,1 ml/l (13) sein, und die Konzentration sollte in allen Gefäßen, ausgenommen die Verdünnungswasserkontrolle, gleich sein. Jedoch sollte die Lösungsmittelkonzentration minimal gehalten werden.

VERFAHREN

Expositionsbedingungen

Dauer

20. Die Prüfung dauert 21 Tage.

Besatz

21. Die Elterntiere werden jeweils einzeln in einem Prüfgefäß in der Regel mit 50 bis 100 ml Prüfmedium in jedem Gefäß gehalten, außer wenn ein Durchflusstest durchgeführt werden muss

(bei *Daphnia magna* können kleinere Volumina verwendet werden, insbesondere bei kleineren Daphnien, z. B. *Ceriodaphnia dubia*).

22. Mitunter können größere Volumina erforderlich sein, um die Anforderungen des Analyseverfahrens, mit dem die Prüfchemikalienkonzentration bestimmt wird, zu erfüllen, wenngleich ein Poolen von Replikaten für die chemische Analyse ebenfalls zulässig ist. Werden größere Volumina als 100 ml verwendet, muss unter Umständen die Futterration der Daphnien erhöht werden, um ein entsprechendes Nahrungsangebot und die Einhaltung der Validitätskriterien sicherzustellen.

Versuchstiere

23. Bei semistatistischen Prüfungen werden mindestens zehn Tiere einzeln bei jeder Prüfkonzentration und mindestens zehn Tiere einzeln in den Kontrollreihen gehalten.
24. Bei Durchflussprüfungen haben sich 40 Tiere, die in vier Gruppen von jeweils zehn Tieren bei jeder Prüfkonzentration aufgeteilt werden, als geeignet erwiesen (1). Es kann eine geringere Anzahl an Prüforganismen verwendet werden, und mindestens 20 Tiere je Konzentration, die in zwei oder mehr Replikate mit einer gleichen Anzahl von Tieren aufgeteilt werden (z. B. vier Replikate mit jeweils fünf Daphnien), werden empfohlen. Zu beachten ist, dass es bei Prüfungen, bei denen die Tiere in Gruppen gehalten werden, nicht möglich sein wird, Nachkommen aus der statistischen Analyse auszuschließen, wenn Elterntiere nach Beginn der Reproduktion aufgrund von Versehen oder aus ungeklärter Ursache sterben. In diesen Fällen sollte die Reproduktionsleistung als „Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro zu Beginn der Prüfung vorhandenem Elterntier“ angegeben werden.
25. Die Behandlungen sollten den Prüfgefäßen zugeordnet werden, und die gesamte anschließende Handhabung der Prüfgefäße sollte nach dem Zufallsprinzip erfolgen. Ist dies nicht der Fall, kann eine Verzerrung auftreten, die als Wirkung der Konzentration ausgelegt werden könnte. Insbesondere wenn Versuchseinheiten in der Reihenfolge der Behandlung oder der Konzentration bearbeitet werden, könnten verschiedene zeitbezogene Faktoren wie beispielsweise die Müdigkeit des Prüfers oder andere Fehler zu größeren Wirkungen bei den höheren Konzentrationen führen. Außerdem sollte eine Blockbildung für die Prüfung in Erwägung gezogen werden, wenn die Prüfergebnisse wahrscheinlich durch eine anfängliche oder umweltbezogene Bedingung der Prüfung, wie z. B. der Position im Labor, beeinflusst werden.

Fütterung

26. Bei semistatistischen Prüfungen sollte die Fütterung möglichst täglich, zumindest jedoch dreimal pro Woche erfolgen (d. h. entsprechend dem Wechsel des Prüfmediums). Die mögliche Verdünnung der Expositionskonzentrationen durch Futterbeimischung sollte berücksichtigt und mit korrekt konzentrierten Algensuspensionen möglichst vermieden werden. Abweichungen hiervon (z. B. bei Durchflussprüfungen) sollten protokolliert werden.

27. Während der Prüfung sollte die Nahrung der Elterntiere möglichst aus lebenden Algenzellen von einer oder mehreren der folgenden Arten bestehen: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (früher *Selenastrum capricornutum*) und *Desmodesmus subspicatus* (früher *Scenedesmus subspicatus*). Die angebotene Nahrung sollte auf der Menge an organischem Kohlenstoff (C) beruhen, die jedem Elterntier zur Verfügung gestellt wird. Untersuchungen (14) haben gezeigt, dass bei *Daphnia magna* Rationen zwischen 0,1 und 0,2 mg C/Daphnie/Tag ausreichend sind, um die zur Erfüllung der Validitätskriterien der Prüfung erforderliche Anzahl an Nachkommen zu erzielen. Die Ration kann entweder aus einer gleichbleibenden Gabe während des gesamten Prüfzeitraums bestehen, oder es kann, sofern gewünscht, am Anfang eine geringere Menge dargeboten werden, die dann im Verlauf der Prüfung erhöht wird, um dem Wachstum der Elterntiere Rechnung zu tragen. In diesem Fall sollte die Ration jederzeit innerhalb des empfohlenen Bereichs von 0,1 bis 0,2 mg C/Daphnie/Tag bleiben.
28. Kommen zur Bestimmung der erforderlichen Futterration Ersatzgrößen zum Einsatz, beispielsweise die Anzahl an Algenzellen oder die Lichtextinktion (aus Gründen der Zweckmäßigkeit, weil die Messung des Kohlenstoffgehalts zeitaufwendig ist), muss jede Prüfeinrichtung ihr eigenes Nomogramm erstellen, in dem die Ersatzgröße in Bezug zum Kohlenstoffgehalt der Algenkultur gesetzt wird (Anleitung zur Erstellung von Nomogrammen siehe Anlage 3). Nomogramme sollten zumindest einmal pro Jahr oder häufiger überprüft werden, wenn sich die Bedingungen für die Algenkultur geändert haben. Dabei hat sich die Lichtextinktion als eine bessere Ersatzgröße für den Kohlenstoffgehalt als die Zellenanzahl erwiesen (15).
29. Den Daphnien sollte eine konzentrierte Algensuspension gefüttert werden, um das Volumen des Algenkulturmediums, das in die Prüfgefäße gelangt, auf ein Mindestmaß zu beschränken. Die Konzentration der Algen lässt sich durch Zentrifugieren mit anschließender Resuspension in Daphnia-Kulturmedium erreichen.

Licht

30. 16 Stunden Licht mit einer Stärke von nicht mehr als $15-20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, gemessen an der Wasseroberfläche des Gefäßes. Bei in Lux kalibrierten Lichtmessgeräten entspricht der Bereich 1000-1500 lx für die Lichtfarbe „cool-white“ etwa der empfohlenen Lichtintensität von $15-20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Temperatur

31. Die Temperatur der Prüfmedien sollte zwischen 18 und 22 °C liegen. Allerdings sollte die Temperatur bei jeder einzelnen Prüfung nach Möglichkeit um nicht mehr als 2 °C innerhalb dieser Grenzwerte als tägliche Spanne schwanken (z. B. 18 bis 20, 19 bis 21 oder 20 bis 22 °C). Zur Überwachung der Temperatur kann die Verwendung eines zusätzlichen Prüfgefäßes angebracht sein.

Belüftung

32. Die Prüfgefäße dürfen während der Prüfung nicht belüftet werden.

Versuchsplanung

Dosisfindungstest

33. Wenn erforderlich, wird ein Dosisfindungstest beispielsweise mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie und zwei Replikaten für jede Behandlung und Kontrolle durchgeführt. Zusätzliche Informationen aus Prüfungen mit ähnlichen Chemikalien oder aus der Literatur zur akuten Toxizität bei Daphnien und/oder anderen Wasserorganismen können ebenfalls hilfreich sein, um die im Dosisfindungstest zu verwendenden Konzentrationen festzulegen.
34. Der Dosisfindungstest dauert 21 Tage oder ausreichend lange, um das Ausmaß der Wirkungen zuverlässig vorherzusagen. Am Ende des Tests wird die Reproduktion der Daphnien bewertet. Die Anzahl der Elterntiere und das Auftreten von Nachkommen sollten protokolliert werden.

Hauptversuch

35. Im Normalfall sollten mindestens fünf Prüfkonzentrationen, die die wirksame Konzentration (z. B. EC_x) einschließen, in einer geometrischen Reihe angeordnet sind und sich um einen Faktor von möglichst nicht mehr als 3,2 voneinander unterscheiden, verwendet werden. Für jede Prüfkonzentration sollte eine angemessene Anzahl an Replikaten eingesetzt werden (siehe Nummern 24 und 25). Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen muss begründet werden. Die Chemikalien sollten nicht oberhalb ihrer Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium geprüft werden. Vor Durchführung der Prüfung sollten die statistische Trennschärfe des Versuchsplans und die Anwendung geeigneter statistischer Methoden überdacht werden (4). Bei der Festlegung des Bereichs von Konzentrationen ist Folgendes zu berücksichtigen:
- i) Wenn die EC_x für Wirkungen auf die Reproduktion geschätzt wird, ist es ratsam, hinreichende Konzentrationen zur Bestimmung der EC_x mit einem angemessenen Konfidenzbereich zu verwenden. Die verwendeten Prüfkonzentrationen sollten vorzugsweise die geschätzte EC_x einschließen, sodass die EC_x durch Interpolation anstatt durch Extrapolation bestimmt werden kann. Für die anschließende statistische Analyse ist es von Vorteil, mehr Prüfkonzentrationen (z. B. zehn) und weniger Replikate je Konzentration (z. B. fünf, um die Gesamtanzahl an Gefäßen konstant zu halten) und zehn Kontrollen zu verwenden.
 - ii) Bei der Bestimmung der LOEC und/oder NOEC sollte die niedrigste Prüfkonzentration so gering sein, dass die Reproduktionsleistung bei dieser Konzentration nicht signifikant niedriger ist als in der Kontrolle. Ist dies nicht der Fall, muss die Prüfung mit einer geringeren niedrigsten Konzentration wiederholt werden.
 - iii) Bei der Bestimmung der LOEC und/oder NOEC sollte die höchste Prüfkonzentration so

hoch sein, dass die Reproduktionsleistung bei dieser Konzentration signifikant niedriger ist als in der Kontrolle. Ist dies nicht der Fall, muss die Prüfung mit einer höheren höchsten Konzentration wiederholt werden, außer wenn die maximal erforderliche Prüfkonzentration für die Prüfung auf chronische Wirkungen (d. h. 10 mg/l) als höchste Prüfkonzentration in der anfänglichen Prüfung verwendet wurde.

36. Wenn im Dosisfindungstest bei der höchsten Konzentration (z. B. 10 mg/l) keine Wirkungen beobachtet werden oder wenn die Prüfchemikalie angesichts der Tatsache, dass sie bei anderen Organismen nicht toxisch wirkt und/oder nur in geringem Maße/nicht aufgenommen wird, höchstwahrscheinlich eine geringe/keine Toxizität besitzt, kann der Reproduktionstest als Limit-Test mit einer Prüfkonzentration von z. B. 10 mg/l und der Kontrolle durchgeführt werden. Für die Behandlungs- und Kontrollgruppen sollten jeweils zehn Replikate verwendet werden. Sollte ein Limit-Test in einem Durchflusssystem durchgeführt werden müssen, sind u. U. auch weniger Replikate möglich. Im Rahmen eines Limit-Tests kann nachgewiesen werden, dass bei der Limit-Konzentration keine statistisch signifikante Wirkung eintritt. Sollten aber Wirkungen festgestellt werden, ist im Normalfall eine vollständige Prüfung erforderlich.

Kontrollen

37. Zusätzlich zu den Testreihen sollten eine Kontrollreihe mit dem Prüfmedium und, sofern zutreffend, auch eine Kontrollreihe mit dem Lösungs- oder Dispergiermittel durchgeführt werden. Werden Lösungs- oder Dispergiermittel verwendet, sollte deren Konzentration gleich den Konzentrationen in den Gefäßen mit der Prüfchemikalie sein. Die entsprechende Anzahl an Replikaten sollte zum Einsatz kommen (siehe Nummern 23 und 24).
38. Im Allgemeinen sollte in einer ordentlich durchgeführten Prüfung der Variationskoeffizient rund um die mittlere Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro Elterntier in der/den Kontrolle(n) produziert werden, $\leq 25\%$ betragen, und dies sollte bei Versuchsplänen mit einzeln gehaltenen Tieren protokolliert werden.

Erneuerung des Prüfmediums

39. Die Häufigkeit, mit der das Prüfmedium erneuert wird, hängt von der Stabilität der Prüfchemikalie ab. Jedoch sollte es zumindest dreimal pro Woche ausgetauscht werden. Wenn aus vorhergehenden Stabilitätsprüfungen (siehe Nummer 7) bekannt ist, dass die Konzentration der Prüfchemikalie während des maximalen Erneuerungszeitraums (d. h. drei Tage) nicht stabil ist (d. h. außerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der nominalen Konzentration oder unterhalb von 80 % der gemessenen anfänglichen Konzentration liegt), sollte ein häufigerer Wechsel des Prüfmediums oder der Einsatz einer Durchflussprüfung in Erwägung gezogen werden.
40. Zur Erneuerung des Mediums in semistatischen Prüfungen wird eine zweite Reihe von Prüfgefäßen vorbereitet, in die die Elterntiere beispielsweise mit einer Glaspipette von geeignetem Durchmesser umgesetzt werden. Dabei sollte die Menge an Prüfmedium, die zusammen mit den Daphnien umgesetzt wird, so gering wie möglich sein.

Beobachtungen

41. Die Ergebnisse der Beobachtungen während der Prüfung sollten auf Datenblättern (siehe Beispiele in den Anlagen 4 und 5) protokolliert werden. Sind andere Messungen erforderlich (siehe Nummer 44), sind gegebenenfalls weitere Beobachtungen erforderlich.

Nachkommen

42. Die Nachkommen, die von jedem Elterntier produziert werden, sollten vom Auftreten der ersten Brut an möglichst täglich entfernt und gezählt werden, um zu verhindern, dass sie die für die erwachsenen Tiere bestimmte Nahrung verbrauchen. Für diese Methode braucht zwar nur die Anzahl an lebenden Nachkommen gezählt zu werden, vorhandene unreife Eier oder tote Nachkommen sollten jedoch ebenfalls festgehalten werden.

Mortalität

43. Sterbefälle unter den Elterntieren sollten möglichst täglich protokolliert werden; sie sollten zumindest zu den gleichen Zeitpunkten gezählt werden wie die Nachkommen.

Sonstige Parameter

44. Dieses Verfahren dient zwar hauptsächlich der Bewertung der Wirkungen auf die Reproduktionsleistung, aber auch andere Auswirkungen können in hinreichendem Maße für eine statistische Auswertung quantifiziert werden. Die Reproduktionsleistung pro überlebendem Elterntier, d. h. die Anzahl der während der Prüfung produzierten lebenden Nachkommen pro überlebendem Elterntier, kann protokolliert werden. Dieser Wert kann mit der wichtigsten Reaktionsvariablen (Reproduktionsleistung pro am Anfang der Prüfung vorhandenem Elterntier, das während der Prüfung nicht aus ungeklärter Ursache oder versehentlich gestorben ist), verglichen werden. Tritt die elterliche Mortalität bei exponierten Replikaten auf, sollte geprüft werden, ob die Mortalität einem Konzentrations-/Wirkungs-Muster folgt, z. B. ob eine signifikante Regression der Reaktion im Verhältnis zur Konzentration der Prüfchemikalie mit positiver Steigung vorliegt (hierzu kann ein statistischer Test wie der Cochran-Armitage-Trendtest verwendet werden). Folgt die Mortalität keinem Konzentrations-/Wirkungs-Muster, dann sollten diejenigen Replikate mit elterlicher Mortalität aus der Analyse des Testergebnisses ausgeschlossen werden. Folgt die Mortalität hingegen einem Konzentrations-/Wirkungs-Muster, sollte die elterliche Mortalität als Wirkung der Prüfchemikalie eingeordnet und die Replikate sollten nicht aus der Analyse des Testergebnisses ausgeschlossen werden. Besonders wünschenswert sind Wachstumsmessungen, denn sie liefern Informationen über mögliche subletale Wirkungen, die unter Umständen nützlicher sind als die Reproduktionsmessung alleine. Empfohlen wird die Vermessung der Länge der Elterntiere (d. h. die Körperlänge ohne Afterstachel) am Ende der Prüfung. Weitere Parameter, die sich messen oder berechnen lassen, sind unter anderem die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut (und folgender Bruten), Anzahl und Umfang der Bruten je Tier, Anzahl an unreifen Eiern, Vorhandensein von männlichen

Schlüpflingen (OECD, 2008) oder Ehippien und die immanente Populationswachstumsrate (siehe Anlage 1 bezüglich Definition und Anlage 7 bezüglich der Geschlechtsbestimmung bei frisch geschlüpften Daphnien).

Häufigkeit von analytischen Bestimmungen und Messungen

45. Sauerstoffkonzentration, Temperatur, Härte und pH-Wert sollten zumindest einmal pro Woche gemessen werden, und zwar in frischen und alten Medien, in der/den Kontrolle(n) und in der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie.
46. Die Konzentrationen der Prüfchemikalie werden während der Prüfung in regelmäßigen Abständen bestimmt.
47. Bei semistatischen Prüfungen, bei denen erwartet wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration konstant bleibt (d. h. innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % – siehe Nummern 6, 7 und 39), wird empfohlen, dass zumindest die höchste und die niedrigste Prüfkonzentration sofort nach der Zubereitung und bei der Erneuerung einmal während der ersten Woche der Prüfung analysiert werden (d. h. Analysen sollten anhand einer Probe derselben Lösung erfolgen – sofort nach der Zubereitung und bei der Erneuerung). Diese Bestimmungen sollten anschließend zumindest in wöchentlichen Abständen wiederholt werden.
48. Bei Prüfungen, bei denen nicht damit zu rechnen ist, dass die Konzentration der Prüfchemikalie innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration konstant bleibt, ist es notwendig, alle Prüfkonzentrationen sofort nach der Zubereitung und bei der Erneuerung zu analysieren. Bei denjenigen Prüfungen jedoch, bei denen die gemessene Anfangskonzentration der Prüfchemikalie zwar nicht innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration stabil bleibt, bei der jedoch hinreichend nachgewiesen werden kann, dass die Anfangskonzentrationen reproduzierbar und stabil sind (d. h. innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der Anfangskonzentrationen), könnten die chemischen Bestimmungen in Woche 2 und 3 der Prüfung auf die höchste und die niedrigste Konzentration reduziert werden. In allen Fällen braucht die Prüfchemikalienkonzentration vor der Erneuerung des Prüfmediums nur an einem Wiederholungsgefäß bei jeder Prüfkonzentration bestimmt zu werden.
49. Bei einer Durchflussprüfung ist ein ähnliches Probenahmeverfahren wie für semistatische Prüfungen beschrieben angebracht (die Messung der „alten“ Lösungen gilt in diesem Fall jedoch nicht). Es kann allerdings ratsam sein, die Anzahl an Probenahmen in der ersten Woche zu erhöhen (z. B. drei Messreihen), um sicherzugehen, dass die Prüfkonzentrationen stabil bleiben. Bei diesen Prüfarten sollte die Durchsatzrate des Verdünnungsmittels und der Prüfchemikalie täglich überprüft werden.
50. Ist nachgewiesen, dass die Konzentration der Prüfchemikalie während der gesamten Prüfung zufriedenstellend innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration oder der gemessenen Anfangskonzentration bleibt, können die Ergebnisse auf nominalen oder gemessenen

Anfangswerten beruhen. Wenn die Abweichung von der nominalen oder gemessenen Anfangskonzentration größer als $\pm 20\%$ ist, sollten die Ergebnisse als zeitgewichtetes Mittel dargestellt werden (siehe Leitfaden für die Berechnung in Anlage 6).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

51. Mit dieser Prüfung soll die Wirkung der Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung bestimmt werden. Für jedes Prüfgefäß (d. h. Replikat) sollte die Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro Elterntier berechnet werden. Darüber hinaus kann die Reproduktion basierend auf der Produktion lebender Nachkommen durch das überlebende Elterntier ermittelt werden. Jedoch ist die aus ökologischer Sicht relevanteste Reaktionsvariable die Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen, die pro Elterntier produziert werden, das während der Prüfung nicht versehentlich¹ oder aus ungeklärter Ursache² stirbt. Wenn das Elterntier während der Prüfung versehentlich oder aus ungeklärter Ursache stirbt oder sich als Männchen herausstellt, dann wird das betreffende Replikat von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse beruht dann auf einer verringerten Anzahl von Replikaten. Tritt die elterliche Mortalität bei exponierten Replikaten auf, sollte geprüft werden, ob die Mortalität einem Konzentrations-/Wirkungs-Muster folgt, z. B. ob eine signifikante Regression der Reaktion im Verhältnis zur Konzentration der Prüfchemikalie mit positiver Steigung vorliegt (hierzu kann ein statistischer Test wie der Cochran-Armitage-Trendtest verwendet werden). Folgt die Mortalität keinem Konzentrations-/Wirkungs-Muster, dann sollten diejenigen Replikate mit elterlicher Mortalität aus der Analyse des Testergebnisses ausgeschlossen werden. Folgt die Mortalität hingegen einem Konzentrations-/Wirkungs-Muster, sollte die elterliche Mortalität als Wirkung der Prüfchemikalie eingeordnet und die Replikate sollten nicht aus der Analyse des Testergebnisses ausgeschlossen werden.
52. Wenn die LOEC und NOEC oder die EC_x zur Angabe der Wirkungen verwendet werden, empfiehlt es sich, die Wirkung auf die Reproduktion durch Verwendung der beiden oben genannten Reaktionsvariablen zu berechnen, d. h.

¹ Auf Versehen zurückzuführende Mortalität: Mortalität ohne Zusammenhang mit der Chemikalie, die durch ein Versehen verursacht wurde (d. h. bekannte Ursache).

² Mortalität ungeklärter Ursache: Mortalität unbekannter Ursache ohne Zusammenhang mit der Chemikalie.

- als Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen, die pro Elterntier produziert wurden, das während der Prüfung nicht versehentlich oder aus ungeklärter Ursache stirbt, und
- als Anzahl an lebenden Nachkommen jedes überlebenden Elterntiers,

und dann als Endergebnis den niedrigsten NOEC- und LOEC- oder EC_x-Wert zu verwenden, der mithilfe einer dieser beiden Reaktionsvariablen berechnet wurde.

53. Vor der statistischen Analyse, z. B. durch ANOVA-Verfahren oder den Vergleich der Behandlungsgruppen mit den Kontrollen durch die Tests von Student (t-Test), Dunnett, Williams oder Jonckheere-Terpstra (Step-Down), empfiehlt es sich zu prüfen, ob die Daten transformiert werden müssen, um die Anforderungen des jeweiligen statistischen Tests zu erfüllen. Als parameterfreie Alternativen können der Dunn- und Mann-Whitney-Test in Betracht gezogen werden. Für einzelne Behandlungsmittelwerte werden 95 %-Konfidenzintervalle berechnet.
54. Die Anzahl der überlebenden Elterntiere in den unbehandelten Kontrollen ist ein Validitätskriterium und sollte dokumentiert und angegeben werden. Ferner sollten alle sonstigen schädlichen Wirkungen, z. B. Abweichungen im Verhalten und signifikante toxikologische Erkenntnisse, im Prüfbericht angegeben werden.

EC_x

55. EC_x-Werte, einschließlich der entsprechenden oberen und unteren Konfidenzgrenzen, werden mit geeigneten statistischen Methoden berechnet (z. B. Logit- oder Weibull-Modell, Trimmed Spearman-Kärber-Methode oder einfache Interpolation). Um den EC₁₀-, EC₅₀- oder einen beliebigen anderen EC_x-Wert zu ermitteln, sollte der komplette Datensatz einer Regressionsanalyse unterzogen werden.

NOEC/LOEC

56. Zur Bestimmung der NOEC-/LOEC-Werte durch statistische Analyse sollten geeignete statistische Methoden angewandt werden (gemäß OECD-Dokument 54 *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*) (4). Im Allgemeinen werden schädliche Wirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich mit der Kontrolle einer einseitigen Hypothesenprüfung mit $p \leq 0,05$ unterzogen.
57. Normalverteilung und Varianzhomogenität können mit einem geeigneten statistischen Test, z. B. Shapiro-Wilk-Test bzw. Levene-Test ($p \leq 0,05$), geprüft werden. Eine einfaktorielle ANOVA und anschließende multiple Vergleichstests können durchgeführt werden. Mit multiplen Vergleichstests (z. B. Dunnett-Test) oder Step-Down-Trendtests (z. B. Williams-Test oder Jonckheere-Terpstra-Test (Step-Down)) kann berechnet werden, ob zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Prüfkonzentrationen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen (Auswahl des empfohlenen Tests gemäß OECD-Dokument 54 (4)). Andernfalls könnten parameterfreie

Methoden (z. B. U-Test mit Bonferroni-/Holm-Korrektur oder Jonckheere-Terpstra-Trendtest) verwendet werden, um den NOEC- und LOEC-Wert zu bestimmen.

Limit-Test

58. Wurde ein Limit-Test (Vergleich der Kontrolle mit einer einzigen Behandlungsgruppe) durchgeführt und sind die Bedingungen für parametrische Prüfverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt, können metrische Reaktionen mit dem Student-t-Test ausgewertet werden. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen (wie z. B. Welch-Test) oder ein parameterfreier Test wie der U-Test nach Mann und Whitney angewandt werden.
59. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen (Kontrollen und Lösungs- oder Dispergiertmittelkontrollen) zu ermitteln, können die Replikate der einzelnen Kontrollen wie für den Limit-Test beschrieben geprüft werden. Werden bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede festgestellt, können alle Replikate der Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle gepoolt werden. Anderenfalls sind alle Behandlungsgruppen mit der Lösungsmittelkontrolle zu vergleichen.

Prüfbericht

60. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

- physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Daten zur chemischen Identität, einschließlich Reinheit.

Gepriüfte Daphnienart:

- der Klon (mit der Angabe, ob er einer Gentyphisierung unterzogen wurde), der Lieferant oder die Bezugsquelle (sofern bekannt) und die zum Einsatz kommenden Kulturbedingungen. Wird eine andere Art als *Daphnia magna* eingesetzt, sollte dies protokolliert und begründet werden.

Prüfbedingungen:

- zum Einsatz kommendes Testverfahren (z. B. semistatisches oder Durchflussverfahren, Volumen, Besatz mit Anzahl Daphnien pro Liter);
- Fotoperiode und Lichtstärke;
- Auslegung der Prüfung (z. B. Anzahl an Replikaten, Anzahl Elterntiere je Replikat);
- nähere Angaben zum verwendeten Kulturmedium;

- sofern verwendet, zugesetztes organisches Material, einschließlich Zusammensetzung, Herkunft, Herstellungsverfahren, TOC/COD der Stammsätze, Schätzung des sich daraus ergebenden TOC/COD im Prüfmedium;
- detaillierte Informationen über die Fütterung, einschließlich Menge (in mg C/Daphnie/Tag) und Plan (z. B. Art von Futtermittel(n), einschließlich spezifischer Name (Art) bei Algen und, sofern bekannt, der Stamm, die Kulturbedingungen);
- Art der Herstellung von Stammsätzen und Häufigkeit der Erneuerung (sofern verwendet, müssen das Lösungs- oder Dispergiermittel und dessen Konzentration angegeben werden).

Ergebnisse:

- Ergebnisse von eventuellen vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität der Prüfchemikalie;
- die nominalen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse aller Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen (siehe Beispieldatenblätter in Anlage 5); die Wiederfindungsrate der Methode und die Bestimmungsgrenze sollten ebenfalls protokolliert werden;
- Wasserqualität in den Prüfgefäßen (d. h. pH-Wert, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs sowie TOC und/oder COD und Härte, soweit zutreffend) (siehe Beispieldatenblatt in Anlage 4);
- die gesamte Aufzeichnung der Produktion lebender Nachkommen je Elterntier während der Prüfung (siehe Beispieldatenblatt in Anlage 4);
- die Anzahl an Todesfällen unter den Elterntieren und der Tag, an dem diese eingetreten sind (siehe Beispieldatenblatt in Anlage 4);
- der Variationskoeffizient für die Reproduktionsleistung der Kontrolle (anhand der Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro Elterntier, das am Ende der Prüfung noch lebt);
- Darstellung der Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro Elterntier (für jedes Replikat), ausschließlich der Elterntiere, die während der Prüfung versehentlich oder aus ungeklärter Ursache gestorben sind, im Verhältnis zur Konzentration der Prüfchemikalie;
- soweit zutreffend, Darstellung der Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen, die pro überlebenden Elterntier in jedem Replikat produziert wurden, im Verhältnis zur Konzentration der Prüfchemikalie;
- soweit zutreffend, die *Lowest Observed Effect Concentration* (LOEC) für die Reproduktion, einschließlich einer Beschreibung der angewandten statistischen Verfahren und einer Angabe zum Umfang der zu erwartenden Wirkung, (hierzu kann vor Beginn des Versuchs eine Teststärkenanalyse durchgeführt werden) und die *No Observed Effect Concentration* (NOEC) für die Reproduktion; Angaben dazu, welche Reaktionsvariable bei der Berechnung der LOEC- und NOEC-Werte (entweder als Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro

Mutterorganismus, der während der Prüfung nicht versehentlich oder aus ungeklärter Ursache gestorben ist, oder als Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro überlebendem Mutterorganismus) verwendet wurde; soweit zutreffend, sollten die LOEC/NOEC für die Mortalität der Elterntiere ebenfalls protokolliert werden;

- soweit zutreffend, die EC_x für die Reproduktion und die Konfidenzintervalle (z. B. 90 % oder 95 %) und ein Diagramm des angepassten Modells, das für die Berechnungen verwendet wurde, die Steigung der Dosis-/Wirkungs-Kurve und deren Standardfehler;
- andere beobachtete biologische Wirkungen oder Messungen: alle anderen biologischen Wirkungen, die beobachtet oder gemessen wurden (z. B. Wachstum von Elterntieren), sollten dokumentiert und angemessen begründet werden;
- eine Erklärung für eine eventuelle Abweichung von der Prüfmethode.

LITERATURHINWEISE

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20.-21. März 1993.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
- (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods.
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) 144-148.

- (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.
- (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
- (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

Bestimmungsgrenze: die niedrigste Konzentration, die quantitativ gemessen werden kann.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

EC_x: die Konzentration der in Wasser gelösten Prüfchemikalie, die innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums zu einer Verringerung der Reproduktion der Daphnien um x Prozent führt.

Elterntiere: diejenigen weiblichen Daphnien, die zu Beginn der Prüfung vorhanden sind und deren Reproduktionsleistung in der Prüfung untersucht werden soll.

Immanente Wachstumsrate: ein Maß für das Wachstum der Population, das die Reproduktionsleistung und die altersspezifische Mortalität mit einbezieht (1) (2) (3). In stabilen Populationen ist die immanente Wachstumsrate gleich null. Bei wachsenden Populationen ist sie positiv, und bei schrumpfenden Populationen ist sie negativ. Letztere ist offensichtlich nicht nachhaltig und führt schließlich zum Aussterben.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): die niedrigste geprüfte Konzentration, bei der innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums eine statistisch signifikante Wirkung der Chemikalie auf die Reproduktion und die Mortalität der Elterntiere (bei $p < 0,05$) im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet wird. Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC sollten jedoch eine mindestens ebenso große schädigende Wirkung haben wie die LOEC. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, sollte die Auswahl der LOEC (und damit auch der NOEC) ausführlich erklärt werden.

Mortalität: Ein Tier wird als tot protokolliert, wenn es unbeweglich ist, d. h., wenn es nicht schwimmen kann oder sich innerhalb von 15 Sekunden nach vorsichtigem Hin- und Herbewegen des Prüfbehälters keine Bewegungen von Extremitäten oder Postabdomen beobachten lassen. (Wird eine andere Definition herangezogen, muss diese zusammen mit dem dazugehörigen Literaturhinweis angegeben werden.)

Mortalität ungeklärter Ursache: Mortalität unbekannter Ursache ohne Zusammenhang mit der Chemikalie.

Mortalität, auf Versehen zurückzuführen: Mortalität ohne Zusammenhang mit der Chemikalie, die durch ein Versehen verursacht wurde (d. h. bekannte Ursache).

Nachkommen: die jungen Daphnien, die von den Elterntieren im Verlauf der Prüfung produziert werden.

Nachweisgrenze: die niedrigste Konzentration, die nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden kann.

No Observed Effect Concentration (NOEC): die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der im Vergleich zu der Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) vorliegt.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

Reproduktionsleistung: die Anzahl lebender Nachkommen, die von Elterntieren während der Prüfung produziert wurden.

Literaturhinweise

- (1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

Anlage 2

HERSTELLUNG DER VOLLSTÄNDIG DEFINIERTEN MEDIEN ELENDT M7 UND M4

Gewöhnung an die Medien Elendt M7 und M4

1. Einige Prüfeinrichtungen haben Schwierigkeiten, Daphnien direkt in die Medien M4 (1) und M7 umzusetzen. Erfolgreich war jedoch eine schrittweise Eingewöhnung, d. h. Wechsel vom eigenen Medium in 30 %iges Elendt, dann in 60 %iges Elendt und dann in 100 %iges Elendt. Die Eingewöhnungszeiten können dabei durchaus einen Monat betragen.

Herstellung

Spurenelemente

2. Zunächst werden gesonderte Stammansätze (I) einzelner Spurenelemente in Wasser mit geeignetem Reinheitsgrad, z. B. entionisiertes oder destilliertes Wasser oder Wasser aus umgekehrter Osmose, hergestellt. Aus diesen unterschiedlichen Stammansätzen (I) wird ein zweiter einziger Stammansatz (II) hergestellt, der alle Spurenelemente enthält (kombinierte Lösung), d. h.:

Stammansätze I (einzelner Stoff)	Dem Wasser zugesetzte Menge mg/l	Konzentration (in Verhältnis zum Medium M4)	Zur Herstellung des kombinierten Stammansatzes II die folgende Menge an Stammansatz I in Wasser geben	
			ml/l	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ •4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ •6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ •2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ •2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ •6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O	5 000	2 000	-	-
FeSO ₄ •7 H ₂ O	1 991	2 000	-	-
Sowohl die Na ₂ EDTA- als auch die FeSO ₄ -Lösung werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort autoklaviert. Dies ergibt:				
Fe-EDTA-Lösung		1 000	20,0	5,0

Medien M4 und M7

3. Die Medien M4 und M7 werden wie folgt aus dem Stammansatz II, Makronährstoffen und Vitaminen hergestellt:

	Dem Wasser zugesetzte Menge mg/l	Konzentration (in Verhältnis zum Medium M4)	Zur Herstellung des Mediums zugesetzte Menge an Stammansatz	
			ml/l	
			M4	M7
Stammansatz II (kombinierte Spurenelemente)		20	50	50
Makronährstoff-Stammansätze (einzelner Stoff)				
CaCl ₂ •2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ •7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ •9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombinierter Vitamin- Stammansatz	-	10 000	0,1	0,1
Der kombinierte Vitamin-Stammansatz wird hergestellt, indem die drei Vitamine wie folgt in 1 Liter Wasser gegeben werden:				
	mg/l			
Thiaminhydrochlorid	750	10 000		
Cyanocobalamin (B12)	10	10 000		
Biotin	7,5	10 000		

Der kombinierte Vitamin-Stammansatz wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt. Die Vitamine werden den Medien kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Hinweis: Um die Ausfällung von Salzen bei der Herstellung der vollständigen Medien zu vermeiden, die Portionen von Stammansätzen in etwa 500-800 ml Wasser entionisiertes Wasser geben und dann auf 1 Liter auffüllen.

Hinweis: Erstmals in einer Publikation erwähnt wird das Medium M4 bei Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. 11(154), 25-33;

Anlage 3

ANALYSE DES GESAMTEN ORGANISCHEN KOHLENSTOFFS (TOC) UND ERSTELLUNG VON NOMOGRAMMEN FÜR DEN TOC-GEHALT VON ALGENFUTTER

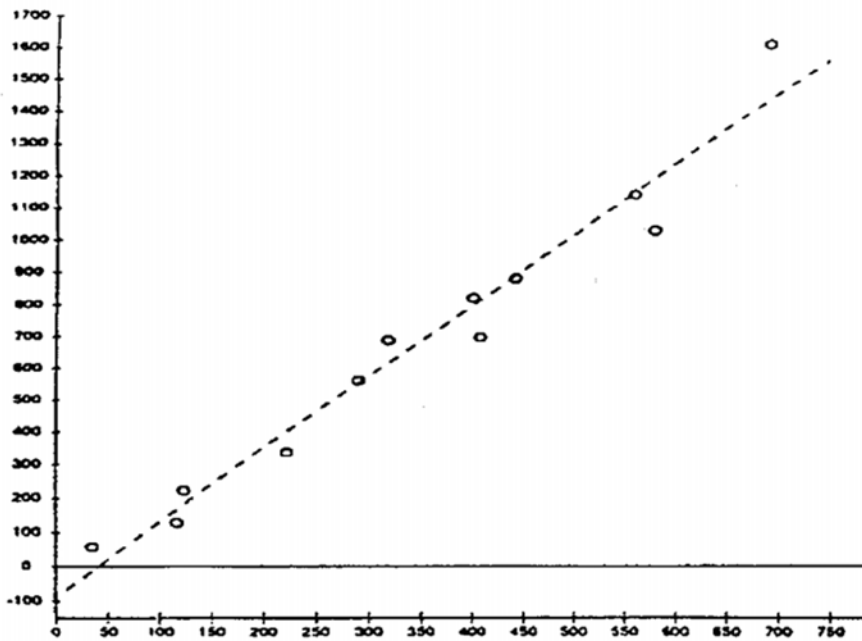
Bekanntermaßen wird der Kohlenstoffgehalt des Algenfutters normalerweise nicht direkt gemessen, sondern aus Korrelationen (d. h. Nomogrammen) mit Ersatzgrößen wie der Algenzellenzahl oder der Lichtextinktion abgeleitet.

Der TOC sollte eher durch Oxidation bei hoher Temperatur als durch UV- oder Persulfatmethoden gemessen werden. (Siehe hierzu auch: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Für die Erstellung von Nomogrammen sollten die Algen durch Zentrifugierung vom Wachstumsmedium getrennt und dann in destilliertem Wasser resuspendiert werden. Der Ersatzparameter und die TOC-Konzentration werden in jeder Probe im Dreifachreplikat gemessen. Es sollten Blindproben des destillierten Wassers analysiert und die TOC-Konzentration von der TOC-Konzentration in der Algenprobe abgeleitet werden.

Die Nomogramme sollten über den geforderten Bereich von Kohlenstoffkonzentrationen linear verlaufen. Es folgen einige Beispiele.

Hinweis: Diese Beispiele sollten nicht für Umrechnungen herangezogen werden. Die Prüfeinrichtungen müssen ihre eigenen Nomogramme erstellen.



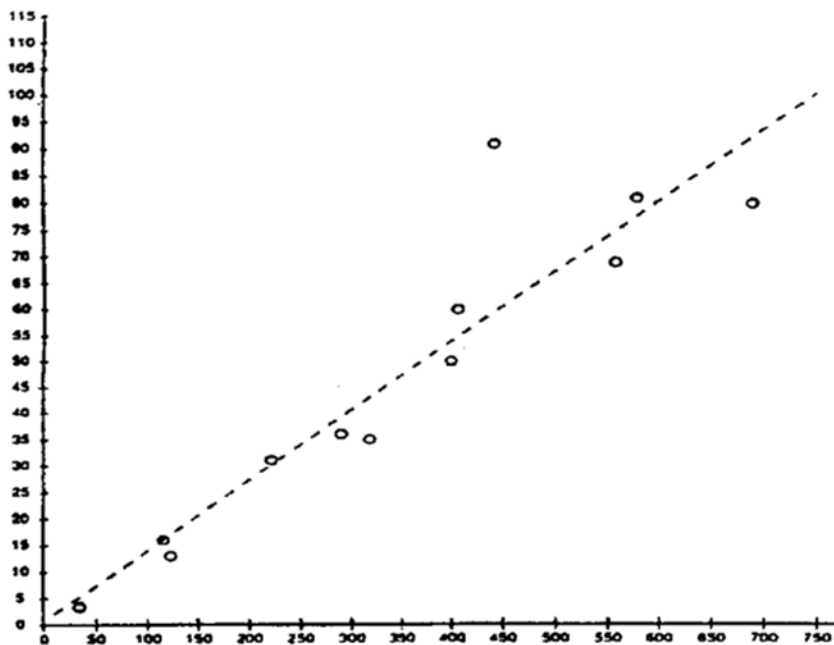
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression von mg/l Trockengewicht zu mg C/l. Daten von konzentrierten Suspensionen von Zellen, die in semi-kontinuierlichen Chargen kultiviert und in destilliertem Wasser resuspendiert wurden.

X-Achse: mg C/l konzentriertes Algenfutter

Y-Achse: mg/l Trockengewicht konzentriertes Algenfutter

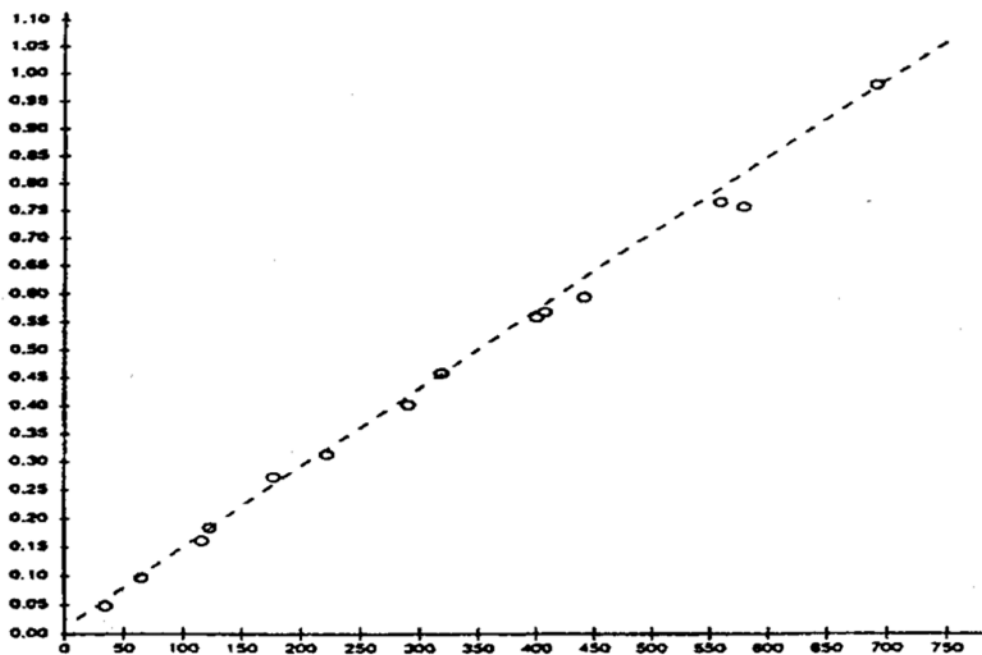
Korrekturkoeffizient -0,980



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression der Zellenzahl zu mg C/l. Daten von konzentrierten Suspensionen von Zellen, die in semi-kontinuierlichen Chargen kultiviert und in destilliertem Wasser resuspendiert wurden.

X-Achse: mg C/l konzentriertes Algenfutter
Y-Achse: Anzahl Zellen/l konzentriertes Algenfutter
Korrekturkoeffizient -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression der Extinktion zu mg C/l (1 cm Pfadlänge). Daten von konzentrierten Suspensionen von Zellen, die in semi-kontinuierlichen Chargen kultiviert und in destilliertem Wasser resuspendiert wurden.

X-Achse: mg C/l konzentriertes Algenfutter

Y-Achse: Extinktion von im Verhältnis 1:10 verdünntem konzentrierten Algenfutter bei 440 nm

Korrekturkoeffizient -0,998

*** Die Mortalität von Elterntieren als „M“ in dem betreffenden Kästchen protokollieren

Anlage 6

BERECHNUNG EINES ZEITGEWICHTETEN MITTELS

Zeitgewichtetes Mittel

Da die Konzentration der Prüfchemikalie sich zwischen den Erneuerungen des Prüfmediums verringern kann, muss überlegt werden, welche Konzentration als repräsentativ für den Konzentrationsbereich, dem die Elterndaphnien ausgesetzt werden, ausgewählt werden sollte. Die Auswahl sollte dabei sowohl auf biologischen als auch auf statistischen Erwägungen beruhen. Geht man beispielsweise davon aus, dass die Reproduktion am stärksten durch die zur Anwendung kommende Spitzenkonzentration beeinflusst wird, dann sollte die maximale Konzentration herangezogen werden. Wird jedoch die kumulierte oder längerfristige Wirkung der toxischen Chemikalie für wichtiger gehalten, dann hat eine Durchschnittskonzentration eine größere Relevanz. In diesem Fall ist die zeitgewichtete mittlere Konzentration zu verwenden, bei der die Schwankung der momentanen Konzentration im Zeitverlauf berücksichtigt wird.

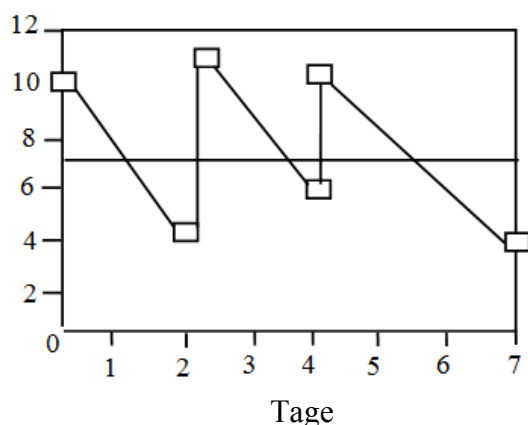


Abbildung 1: Beispiel für ein zeitgewichtetes Mittel

Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine (vereinfachte) Prüfung über sieben Tage, bei der das Prüfmedium an den Tagen 0, 2 und 4 erneuert wird.

- Die dünne Zickzacklinie stellt die Konzentration im Zeitverlauf dar. Es wird angenommen, dass der Rückgang der Konzentration einem exponentiellen Zerfallsprozess folgt.
- Die sechs eingezeichneten Punkte stellen die beobachteten Konzentrationen dar, die am Anfang und am Ende jedes Erneuerungszeitraums gemessen wurden.
- Die dicke durchgezogene Linie gibt die Lage des zeitgewichteten Mittels an.

Das zeitgewichtete Mittel wird so berechnet, dass die Fläche unterhalb des zeitgewichteten Mittels gleich der Fläche unterhalb der Konzentrationskurve ist. Die Berechnung für das oben genannte Beispiel ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Berechnung des zeitgewichteten Mittels

Erneuerung Nr.	Tage	Konz0	Konz1	ln(Konz0)	ln(Konz1)	Fläche
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Gesamtanzahl Tage:	7				Gesamtfläche: Zeitgew. Mittel:	50,092 7,156

Tage steht für die Anzahl von Tagen des Erneuerungszeitraums.

Konz0 ist die gemessene Konzentration zu Beginn jedes Erneuerungszeitraums.

Konz1 ist die gemessene Konzentration am Ende jedes Erneuerungszeitraums.

$\ln(\text{Konz}0)$ ist der natürliche Logarithmus von *Konz0*.

$\ln(\text{Konz}1)$ ist der natürliche Logarithmus von *Konz1*.

Fläche ist die Fläche unter der exponentiellen Kurve für jeden Erneuerungszeitraum. Sie wird wie folgt berechnet:

$$\text{Fläche} = \frac{\text{Konz}0 - \text{Konz}1}{\ln(\text{Konz}0) - \ln(\text{Konz}1)} \times \text{Tag}$$

Das zeitgewichtete Mittel (*zeitgew. Mittel*) ist gleich der *Gesamtfläche* dividiert durch die *Gesamtanzahl Tage*.

Natürlich müsste die Tabelle für den Daphnien-Reproduktionstest auf einen Zeitraum von 21 Tagen erweitert werden.

Wenn Beobachtungen nur am Anfang und am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums erfolgen, kann natürlich nicht bestätigt werden, ob der Zerfallsprozess tatsächlich exponentiell verläuft. Eine andere Kurve würde zu einer anderen Berechnung für die *Fläche* führen. Jedoch ist ein exponentieller Zerfallsprozess durchaus plausibel und wahrscheinlich die beste Kurve, die bei Fehlen anderer Informationen zu verwenden ist.

Vorsicht ist allerdings geboten, wenn in der chemischen Analyse am Ende des Erneuerungszeitraums keine Chemikalie gefunden wird. Wenn keine Möglichkeit besteht, abzuschätzen, wie schnell die Chemikalie aus der Lösung verschwunden ist, ist es

unmöglich, eine realistische Fläche unter der Kurve zu erhalten, und damit auch unmöglich, ein plausibles zeitgewichtetes Mittel zu bestimmen.

Anlage 7

LEITFADEN FÜR DIE GESCHLECHTSBESTIMMUNG BEI FRISCH GESCHLÜPFTEN DAPHNIEN

1. Unter wechselnden Umgebungsbedingungen, wie z. B. Verkürzung der Fotoperiode, Temperaturschwankungen, Verringerung der Futterkonzentration und Erhöhung der Populationsdichte (Hobaek und Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992), können männliche Nachkommen produziert werden. Die Produktion männlicher Tiere ist auch eine bekannte Reaktion auf Insektenwachstumsregulatoren (Oda *et al.*, 2005). Unter bestimmten Bedingungen, unter denen chemische Stressoren eine Verringerung der reproduktiven Nachkommen von parthenogenetischen Weibchen induzieren, wäre eine erhöhte Anzahl Männchen zu erwarten (OECD, 2008). Auf der Grundlage der vorliegenden Informationen lässt sich nicht vorhersagen, ob der Endpunkt „Geschlechterverhältnis“ oder der Endpunkt „Reproduktion“ empfindlicher ist; es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür (vgl. „Validierungsbericht“, Teil 1), dass dieser Anstieg der Anzahl männlicher Tiere weniger empfindlich sein könnte als der Rückgang der Nachkommenschaft. Da der wichtigste Zweck der Prüfmethode darin besteht, die Anzahl an produzierten Nachkommen zu bestimmen, stellt das Auftreten männlicher Tiere eine optionale Beobachtung dar. Wird dieser optionale Endpunkt in einer Studie bewertet, sollte ein zusätzliches Testvaliditätskriterium von höchstens 5 % männlichen Tieren in den Kontrollen angewandt werden.
2. Die praktischste und einfachste Methode zur Geschlechtsbestimmung bei Daphnien besteht in der Nutzung ihrer phänotypischen Merkmale, da männliche und weibliche Tiere genetisch identisch und ihr Geschlecht abhängig von der Umgebung ist. Männliche und weibliche Tiere unterscheiden sich in Länge und Morphologie der ersten Antennen, die bei den Männchen länger sind (Abbildung 1). Dieser Unterschied ist direkt nach dem Schlüpfen erkennbar, während sich andere sekundäre Geschlechtsmerkmale mit dem Heranwachsen ausbilden (z. B. siehe Abbildung 2 in Olmstead und LeBlanc, 2000).
3. Zur Bestimmung des morphologischen Geschlechts sollten die von jedem Versuchstier produzierten Schlüpflinge per Pipette umgesetzt und in eine Petrischale mit Prüfmedium gelegt werden. Das Medium wird minimal gehalten, um die Bewegung der Tiere einzuschränken. Die ersten Antennen können unter einem Stereomikroskop ($\times 10-60$) beobachtet werden.

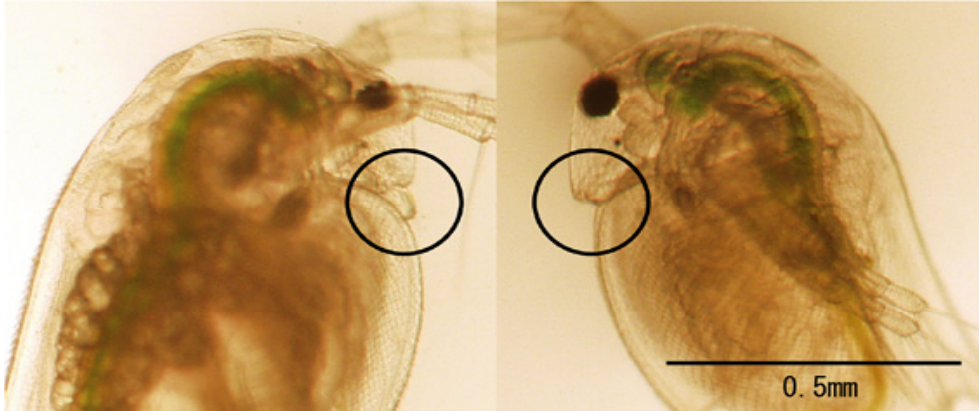


Abbildung 1 24 Stunden altes Männchen (links) und Weibchen (rechts) der Art *D. magna*. Männchen unterscheiden sich in Länge und Morphologie der ersten Antennen von den Weibchen wie in den Kreisen gezeigt (Tatarazako *et al.*, 2004).

REFERENZDOKUMENTE

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.“

(18) In Teil C erhält Kapitel C.29 Nummer 66 folgende Fassung:

„66. Der Test ist gültig, wenn

- a) der mittlere Abbauprozentsatz der Referenzchemikalie in den Gefäßen F_C am 14. Tag der Inkubation $> 60 \%$ ist; und
- b) die mittlere Menge an TIC in den Blindkontrollen F_B am Ende des Tests $< 3 \text{ mg C/l}$ beträgt.

Werden diese Grenzwerte nicht erreicht, so sollte der Versuch mit einem Inokulum aus einer anderen Quelle wiederholt werden und/oder sollten die angewandten Verfahren überprüft werden. Bereitet z. B. die starke IC-Produktion in den Blindkontrollen Probleme, so ist das unter den Nummern 27 bis 32 beschriebene Verfahren anzuwenden.“