



Rat der
Europäischen Union

Brüssel, den 25. Februar 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

ÜBERMITTLUNGSVERMERK

Absender: Europäische Kommission
Eingangsdatum: 22. Februar 2019
Empfänger: Generalsekretariat des Rates
Nr. Komm.dok.: D060575/02 ANNEX

Betr.: Anhang der 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 D060575/02 ANNEX.

Anl.: D060575/02 ANNEX

6800/19 ADD 2

/ab

ECOMP.3.A

DE

Anhang – Teil 2/2

B.71 IN-VITRO-TESTS ZUR SENSIBILISIERUNG DER HAUT IN BEZUG AUF DEN SCHLÜSSELVORGANG DER AKTIVIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN AUF DEM ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP) FÜR DIE SENSIBILISIERUNG DER HAUT

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Prüfmethode auf der Grundlage des Schlüsselvorgangs der Aktivierung von dendritischen Zellen

1. Ein Hautallergen ist gemäß Definition des Globalen Harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) der Vereinten Nationen (UN-GHS) (1) und der Verordnung (EU) Nr. 1272/2008 der Europäischen Union über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP)¹ ein Stoff, der bei Hautkontakt eine allergische Reaktion auslöst. Über die biologischen Schlüsselvorgänge, die der Sensibilisierung der Haut zugrunde liegen, besteht allgemeines Einvernehmen. Das derzeitige Wissen über die chemischen und biologischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Hautsensibilisierung wurde in Form eines Adverse Outcome Pathway (AOP) unter dem OECD-AOP-Programm (2), ausgehend von dem auslösenden molekularen Ereignis über die Zwischenvorgänge bis hin zur schädlichen Auswirkung auf die Gesundheit, nämlich die allergische Kontaktdermatitis, zusammengefasst. In diesem Fall ist das auslösende molekulare Ereignis (d. h. der erste Schlüsselvorgang) 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 Änderungen der Genexpression in Verbindung mit spezifischen

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).

Zellsignalketten wie beispielsweise ARE (Antioxidant/Electrophile Response Element)-abhängigen Ketten. Der dritte Schlüsselvorgang ist die Aktivierung von dendritischen Zellen (DC), die normalerweise durch Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern, Chemokinen und Cytokinen bewertet werden. Der vierte Schlüsselvorgang ist die T-Zellaktivierung und -proliferation, die indirekt im Lokalen Lymphknotentest (LLNA) an der Maus (3) bewertet wird.

2. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 442E (2017). Sie beschreibt die In-vitro-Tests in Bezug auf Mechanismen im Rahmen des Schlüsselvorgangs der Aktivierung von dendritischen Zellen des AOP für die Sensibilisierung der Haut (2). Die Testmethode umfasst Tests, die zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren gemäß UN-GHS und CLP durchgeführt werden.

Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests umfassen:

- Aktivierungstest mit humanen Zelllinien (h-CLAT)
 - U937 Aktivierungstest mit Zelllinien (U-SENSTM)
 - Interleukin-8 Reporter-Test (IL-8 Luc-Test)
3. Die Tests in dieser Prüfmethode und die entsprechenden OECD-TG können sich in Bezug auf das Verfahren zur Erzeugung der Daten und der gemessenen Werte unterscheiden, können aber gleichermaßen verwendet werden, um die länderspezifischen Anforderungen an die Prüfergebnisse des Schlüsselvorgangs zur Aktivierung dendritischer Zellen des AOP für die Hautsensibilisierung zu erfüllen; zugleich findet die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen auf sie Anwendung.

Hintergrund und Prinzipien der Tests, die in der auf den Schlüsselvorgang gestützten Prüfmethode enthalten sind

4. Die Bewertung der Hautsensibilisierung erfolgte normalerweise an Labortieren. Bei den klassischen Methoden an Meerschweinchen, dem Maximierungstest an Meerschweinchen (Guinea Pig Maximisation Test, GPMT) nach Magnusson/Kligman und dem Bühler-Test (Prüfmethode B.6) (4), werden die Induktions- und die Auslösephase der Hautsensibilisierung bewertet. Ein Test an der Maus, der Lokale Lymphknotentest (LLNA, Prüfmethode B.42) (3) und die beiden nicht radioaktiven Abwandlungen dieser Tests, LLNA: DelR (Prüfmethode B.50) (5) und LLNA: BrdU-ELISA (Prüfmethode B.51) (6), bei denen jeweils nur die 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.

5. Kürzlich wurden mechanistisch basierte In-chemico- und In-vitro-Prüfmethoden in Bezug auf den ersten Schlüsselvorgang (Prüfmethode B.59; Direkt-Peptidreaktivitätstest (7)) und den zweiten Schlüsselvorgang (Prüfmethode B.60; ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode (8)) des Hautsensibilisierungs-AOP als Beitrag zur Bewertung des Gefahrenpotenzials für die Hautsensibilisierung von Chemikalien eingeführt.
6. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests quantifizieren entweder die Änderung der Expression von Zelloberflächenmarkern im Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) nach Exposition gegenüber Allergenen (z. B. CD54, CD86) oder die Änderungen der IL-8-Expression, einem Zytokin in Verbindung mit der Aktivierung von DC. Es wurde berichtet, dass Hautallergene die Expression von Zellmembranmarkern wie CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86 zusätzlich zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α und mehreren Chemokine wie IL-8 (CXCL8) und CCL3 (9) (10) (11) (12) im Zusammenhang mit der DC-Aktivierung induzieren (2).
7. Da die DC-Aktivierung jedoch nur einen einzigen Schlüsselvorgang des Hautsensibilisierungs-AOP darstellt (2) (13), reichen Informationen, die mit Tests erzeugt werden, die nur Marker der DC-Aktivierung messen, möglicherweise nicht aus, um auf das Vorhandensein oder Fehlen eines Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien zu schließen. Daher sollten die mit dieser Prüfmethode ermittelten Daten zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kategorie 1) und Nichtsensibilisatoren im Rahmen integrierter Ansätze (IATA) eingesetzt 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 (13), kombiniert werden. Beispiele zur Verwendung von Daten, die mit diesen Tests im Rahmen definierter Ansätze erzeugt wurden, d. h. standardisierter Ansätze sowohl in Bezug auf den Satz der verwendeten Informationsquellen als auch in Bezug auf das Verfahren zur Ableitung von Vorhersagen, wurden veröffentlicht (13) und können innerhalb des IATA als nützliche Elemente verwendet werden.
8. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen Tests können alleine weder zur Einstufung von Hautallergenen in die Unterkategorien 1A und 1B gemäß Definition in UN-GHS/CLP (für Behörden, die diese zwei optionalen Unterkategorien einführen), noch zur Vorhersage des

Potenzials im Rahmen von Sicherheitsbewertungsentscheidungen verwendet werden. Jedoch können mithilfe dieser Methoden erzeugte positive Ergebnisse je nach Rechtsrahmen alleine zur Einstufung einer Chemikalie in die UN-GHS/CLP-Kategorie 1 herangezogen werden.

9. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was getestet¹ wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Tests zur Prüfung von einkomponentigen Stoffen, mehrkomponentigen Stoffen und/oder Gemischen. Gegenwärtig stehen nur begrenzte Informationen über die Anwendbarkeit der Tests für mehrkomponentige Stoffe/Gemische zur Verfügung (14) (15). Die Tests sind dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum.² Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemisches gesetzlich vorgeschrieben ist. Zudem sollte bei mehrkomponentigen Stoffen oder Gemischen die mögliche Interferenz der zytotoxischen Komponenten mit den beobachteten Reaktionen beachtet werden.

¹ Im Juni 2013 einigte sich die Gemeinsame Tagung der OECD darauf, dass nach Möglichkeit eine einheitlichere Verwendung des Begriffs „Prüfchemikalie“ – der beschreibt, was geprüft wird – in neuen und aktualisierten OECD-Prüfleitlinien verwendet werden sollte.

² Dieser Satz wurde in der April 2014 WNT-Sitzung vorgeschlagen und vereinbart.

LITERATURHINWEISE

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sechste überarbeitete Auflage. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/rev06/06files_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 No. 168. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Kapitel B.42 in diesem Anhang: Lokaler Lymphknotentest. Kapitel B.6 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut.
- (4) Kapitel B.50 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut: Lokaler Lymphknotentest: DA.
- (5) Kapitel B.51 in diesem Anhang: Sensibilisierung der Haut: Lokaler Lymphknotentest: BrdU-ELISA.
- (6) Kapitel B.59 in diesem Anhang: In-chemico-Hautsensibilisierung: Direkt-Peptidreaktivitätstest (DPRA).
- (7) Kapitel B.60 in diesem Anhang: In-vitro-Hautsensibilisierung: ARE-Nrf2 Luciferase-Prüfmethode.
- (8) Steinman, RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–96.
- (9) Caux, C., Vanbervliet B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, LL. und Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841–7.
- (10) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H. und Tagami, H. (1997). Dendritic

cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031–8.

- (11) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, ZU., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y. und Tagami, H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390–8.
- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/H(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinuzzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

Anlage 1

IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: AKTIVIERUNGSTEST MIT HUMANEN ZELLINNEN (H-CLAT)

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Der h-CLAT quantifiziert die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) (d. h. CD86 und CD54) in der humanen monozytischen Leukämie-Zelllinie THP-1 nach Exposition gegenüber Allergenen (1)(2). Die gemessenen Expressionswerte der Zelloberflächenmarker CD86 und CD54 werden dann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren verwendet.
2. Der h-CLAT wurde in einer Validierungsstudie unter der Leitung eines Europäischen Referenzlabors für Alternativen zu Tiersversuchen (EURL ECVAM) und in einer anschließenden unabhängigen Peer-Review des Wissenschaftlich Beratenden Ausschusses (ESAC) des EURL ECVAM bewertet. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Regulierungsbehörden und Interessengruppen wurde der h-CLAT von EURL ECVAM (3) empfohlen, um im Rahmen eines IATA die Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren im Hinblick auf die Gefahreninstufung und -kennzeichnung zu unterstützen. Beispiele für die Verwendung von h-CLAT-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. Der h-CLAT erwies sich als übertragbar auf Labore mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkulturtechniken und der Flusszytometrieanalyse. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei den Tests erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 80 % innerhalb von und zwischen Labors (3)(12). Die in der Validierungsstudie (13) und anderen veröffentlichten Studien (14) erzeugten Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kat.1) und Nichtsensibilisatoren im Vergleich zu den LLNA-Ergebnissen bei 85 % (N = 142) mit einer Empfindlichkeit von 93 % (94/101) und einer Spezifität von 66 % (27/41) liegt (gestützt auf eine erneute Analyse durch EURL ECVAM (12), wobei alle bestehenden

Daten berücksichtigt und alle negativen Ergebnisse für Chemikalien mit log KOW von mehr als 3,5 wie in Abschnitt 4 beschrieben nicht berücksichtigt wurden). Bei falsch-negativen Vorhersagen mit dem h-CLAT ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz betroffen sind (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B), als Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (4)(13)(15). Insgesamt deuten diese Informationen auf die Zweckmäßigkeit der h-CLAT-Methode für die Erkennung der Gefahr einer Hautsensibilisierung hin. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für den h-CLAT als eigenständiger Tests angegeben werden, lediglich als Anhaltspunkte zu betrachten, da der Test in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 der Allgemeinen Einleitung 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 Menschen nicht vollständig widerspiegeln.

4. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über die h-CLAT-Methode wurde nachgewiesen, dass der Test bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzialen (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (3)(14)(15). Die h-CLAT-Methode ist anwendbar bei Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder sich vom Lösungsmittel/Vehikel in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösungsmittel/Vehikel bilden (siehe Abschnitt 14). Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 tendieren dazu, falsch negative Ergebnisse hervorzurufen (14). Deshalb sollten negative Ergebnisse bei Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 nicht berücksichtigt werden. Positive Ergebnisse für Prüfchemikalien mit einem log Kow von mehr als 3,5 könnten jedoch noch verwendet werden, um die Identifizierung der Prüfchemikalie als Hautallergen zu unterstützen. Außerdem können Prohaptene (d. h. Stoffe, die beispielsweise über P450-Enzyme aktiviert werden müssen) und Prähaptene (d. h. Stoffe, die durch Oxidation aktiviert werden) aufgrund der begrenzten Stoffwechselfähigkeit der verwendeten Zelllinie (16) sowie der Versuchsbedingungen, insbesondere bei geringer Oxidationsgeschwindigkeit, zu negativen Ergebnissen des h-CLAT (15) führen. Fluoreszierende Prüfchemikalien können mit h-CLAT (17) bewertet werden; dennoch beeinträchtigen stark fluoreszierende Prüfchemikalien, die mit derselben Wellenlänge ausstrahlen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Propidiumjodid (PI), den Nachweis mittels Durchflusszytometrie und können daher nicht korrekt mithilfe von mit FITC-konjugierten Antikörpern oder PI bewertet werden. In einem solchen Fall können andere mit Fluorochrom markierte Antikörper bzw. andere

Zytotoxizitätsmarker verwendet werden, solange aufgezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse liefern wie die mit FITC markierten Antikörper (siehe Abschnitt 24) oder PI (siehe Abschnitt 18), z. B. durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1–2. Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten negative Ergebnisse im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen von IATA interpretiert werden. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit der h-CLAT-Methode bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte sie bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

5. Die h-CLAT-Methode unterstützt, wie bereits oben 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 (4)(5)(9). Es sind dennoch weitere Untersuchungen erforderlich, vorzugsweise auf der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse des h-CLAT möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.
6. Definitionen sind Anlage 1.1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Die h-CLAT-Methode ist ein In-vitro-Test, der Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern (d. h. CD86 und CD54) auf einer humanen monozytischen Leukämiezelllinie, THP-1-Zellen, nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie quantifiziert. Diese Oberflächenmoleküle sind typische Marker der monotypischen THP-1-Aktivierung und können die DC-Aktivierung eventuell nachahmen, die eine kritische Rolle bei der T-Zellenvorbehandlung spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern werden mittels Durchflusszytometrie nach Zellfärbung mit Antikörpern, die mit Fluorochrom markiert wurden, gemessen. Die Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls zur gleichen Zeit durchgeführt, um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression von Oberflächenmarkern bei Konzentrationen unterhalb des zytotoxischen Werts auftritt. Die relative Fluoreszenzintensität der Oberflächenmarker im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet (siehe 26), um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zu unterstützen.

NACHWEIS DER KOMPETENZ

8. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 1.2 aufgeführten Leistungsstoffe nachweisen. Darüber hinaus sollten Prüfungsgeber eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätsprüfungen (siehe Abschnitt 11) und mit den positiven sowie Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 20–22) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit der Prüfung in ihrem Labor im Lauf der Zeit aufrechterhalten wird.

VERFAHREN

9. Diese Prüfmethode basiert auf dem h-CLAT-DataBase-Dienst für alternative Methoden zur Durchführung von Tierversuchen (DB-ALM) Protokoll Nr. 158 (18), das für die vom EURL ECVAM koordinierte Validierungsstudie verwendet wurde. Es wird empfohlen, dieses Protokoll bei der Durchführung und Anwendung der h-CLAT-Methode im Labor zugrunde zu legen. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren der h-CLAT-Methode beschrieben, die zwei Schritte umfasst: *Test zur Dosisfindung* und *CD86/CD54-Expressionsmessung*.

Vorbereitung der Zellen

10. Bei Ausführung der h-CLAT-Methode sollte die humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1 verwendet werden. Es wird empfohlen, dass Zellen (TIB-202™) aus einer gut qualifizierten Zellbank wie der American Type Culture Collection entnommen werden.
11. THP-1-Zellen werden bei 37 °C unter 5 % CO₂ und einer befeuchteten Atmosphären in einem mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereicherten RPMI-1640-Medium kultiviert. Die Verwendung von Penicillin und Streptomycin im Kulturmedium kann vermieden werden. In einem solchen Fall sollten Benutzer jedoch verifizieren, dass das Nichtvorhandensein von Antibiotika im Kulturmedium keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat, beispielsweise durch Testen der in Anlage 1.2 aufgeführten Leistungsstoffe. Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, sollten bewährte Zellkulturpraktiken auf jeden Fall unabhängig vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Antibiotika im Zellkulturmedium befolgt werden. THP-1-Zellen werden regelmäßig alle 2–3 Tage bei einer Dichte von 0,1 bis $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Es sollten Zelldichten von 0,1 bis $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml gewahrt werden. Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollten die Zellen qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Der Reaktivitätstest der Zellen sollte mithilfe

der positiven Kontrollen, 2,4-Dinitrochlorbenzol (DNB) (CAS Nr. 97-00-7, ≥99 % Reinheit) und Nickelsulfat (NiSO_4) (CAS Nr. 10101-97-0, ≥99 % Reinheit) und der negativen Kontrolle, Milchsäure (LA) (CAS Nr. 50-21-5, ≥85 % Reinheit) zwei Wochen nach dem Auftauen durchgeführt werden. DNB und NiSO_4 sollten eine positive Reaktion auf CD86- und CD54-Zelloberflächenmarker ergeben und LA sollte eine negative Reaktion auf CD86- und CD54-Zelloberflächenmarker ergeben. Nur die Zellen, welche den Reaktivitätstest bestanden haben, dürfen für den Test verwendet werden. Zellen können bis zu zwei Monate nach dem Auftauen gewonnen werden. Die Passagenanzahl sollte 30 nicht übersteigen. Der Reaktivitätstest sollte gemäß den in den Abschnitten 20–24 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

12. Zur Prüfung werden die THP-1-Zellen bei einer Dichte von entweder $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml oder $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und in Kulturkolben 72 bzw. 48 Stunden lang vorgezüchtet. Es ist wichtig, dass die Zelldichte im Kulturkolben direkt nach dem Vorkulturzeitraum bei jedem Versuch so konstant wie möglich ist (indem eine der zwei oben beschriebenen Vorkulturbedingungen angewandt wird), da die Zelldichte im Kulturkolben direkt nach der Vorkultur die von Allergenen induzierte CD86/CD54-Expression beeinträchtigen könnte (19). Am Tag des Tests werden die Zellen, die aus dem Kulturkolben geerntet wurden, mit einem frischen Kulturmedium mit 2×10^6 Zellen/ml neu angesetzt. Dann werden die Zellen in eine flache Platte mit 24 Mulden und 500 µl (1×10^6 Zellen/Mulde) oder eine flache Platte mit 96 Mulden und 80 µl ($1,6 \times 10^5$ Zellen/Mulde) verteilt.

Test zur Dosisfindung

13. Ein *Test zur Dosisfindung* wird durchgeführt, um CV75 zu bestimmen. Dies ist die Prüfchemikalienkonzentration, die im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle zu einer Zellviabilität (CV) von 75 % führt. Der CV75-Wert wird verwendet, um die Konzentration der Prüfchemikalien für die CD86/CD54-Expressionsmessung zu bestimmen (siehe Abschnitte 20–24).

Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

14. Die Prüfchemikalien sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Bei der h-CLAT-Method werden die Prüfchemikalien in Kochsalzlösung oder einem Medium, als erste Lösungsmittel-/Vehikeloptionen, oder Dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % Reinheit), als zweite Lösungsmittel-/Vehikeloption, aufgelöst oder stabil verteilt (siehe auch Abschnitt 4), falls die Prüfchemikalie in den zwei zuvor genannten Lösungsmitteln/Vehikeln mit

endgültigen Konzentrationen von 100 mg/ml (in Kochsalzlösung oder Medium) oder 500 mg/ml (in DMSO) nicht löslich ist oder keine stabile Verteilung ausbildet. Andere als die oben beschriebenen Lösungsmittel/Vehikel können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung gegeben wird. Die Stabilität der Prüfchemikalie im endgültigen Lösungsmittel/Vehikel sollte berücksichtigt werden.

15. Ausgehend von den 100 mg/ml- (in Kochsalzlösung oder Medium) oder 500 mg/ml- (in DMSO) Stammlösungen der Prüfchemikalien sollten die folgenden Verdünnungsschritte durchgeführt werden:

- Für Kochsalzlösung oder Medium als Lösungsmittel/Vehikel: Acht Stammlösungen (acht Konzentrationen) werden nach zweifachen seriellen Verdünnungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet. Diese Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 50-fach weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Wenn die obere endgültige Konzentration in der Platte von 1000 µg/ml nicht toxisch ist, sollte die maximale Konzentration erneut bestimmt werden, indem eine neue Zytotoxizitätsprüfung durchgeführt wird. Die endgültige Konzentration in der Platte sollte 5000 µg/ml für Prüfchemikalien, die in Kochsalzlösung oder einem Medium gelöst oder stabil verteilt wurden, nicht überschreiten.
- Für DMSO als Lösungsmittel/Vehikel: Acht Stammlösungen (acht Konzentrationen) werden nach zweifachen seriellen Verdünnungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet. Diese Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 250-fach weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Die endgültige Konzentration in der Platte sollte 1000 µg/ml nicht überschreiten, auch wenn die Konzentration nicht toxisch ist.

Die Arbeitslösungen werden schließlich zur Exposition verwendet, indem eine gleiche Menge an Arbeitslösung zum Volumen der THP-1-Zellsuspension in der Platte hinzugefügt wird (siehe auch Abschnitt 17), um eine weitere zweifache Verdünnung zu erhalten (normalerweise beträgt der endgültige Bereich an Konzentrationen in der Platte 7,81–1000 µg/ml).

16. Die bei der h-CLAT-Methode verwendete Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle ist das Kulturmedium (für mit Medium oder Kochsalzlösung löslich gemachte oder stabil verteilte (siehe Abschnitt 4) Prüfchemikalien) oder DMSO (für in DMSO löslich gemachte oder stabil verteilte Prüfchemikalien), die bei einer einzigen endgültigen Konzentration in der

Platte von 0,2 % geprüft wurden. Hier wird dasselbe Verdünnungsverfahren verwendet, das für Arbeitslösungen in Abschnitt 15 beschrieben wird.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

17. Das Kulturmedium oder die Arbeitslösungen, die in den Abschnitten 15 und 16 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 24 oder 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 12). Die behandelten Platten werden dann $24 \pm 0,5$ Stunden bei 37°C unter 5 % CO_2 inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden werden, indem die Platte beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien versiegelt wird (20).

Färben mit Propidiumjodid (PI)

18. Nach einer Expositionszeit von $24 \pm 0,5$ Stunden werden die Zellen in Probenröhrchen übertragen und durch Zentrifugierung gesammelt. Die Überstände werden entsorgt und die verbleibenden Zellen werden mit 200 μl (im Falle von 96 Mulden) oder 600 μl (im Falle von 24 Mulden) einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserum-Albumin (Färbpuffer) resuspendiert. 200 μl der Zellsuspension werden in eine Platte mit gewölbtem Boden und 96 Mulden (im Falle von 96 Mulden) oder ein Mikroröhrchen (im Falle von 24 Mulden) gegeben und zweimal mit 200 μl (im Falle von 96 Mulden) oder 600 μl (im Falle von 24 Mulden) Färbpuffer gewaschen. Schließlich werden die Zellen in Färbpuffer (z. B. 400 μl) resuspendiert und es wird PI-Lösung (z. B. 20 μl) hinzugefügt (zum Beispiel ist die endgültige Konzentration von PI 0,625 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Andere Zytotoxizitätsmarker wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), Trypan blau oder andere können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass die alternativen Farbstoffe ähnliche Ergebnisse liefern wie PI, zum Beispiel durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1.2.

Zytotoxizitätsmessung anhand von Durchflusszytometrie und Schätzung von CV75-Wert

19. Die PI-Aufnahme wird anhand der Durchflusszytometrie mit dem Aufnahmekanal FL-3 analysiert. Es werden insgesamt 10 000 lebende Zellen (PI negativ) aufgenommen. Die Zellviabilität kann anhand der folgenden Gleichung über das Zytometeranalyseprogramm berechnet werden. Wenn die Zellviabilität gering ist, sollten bis zu 30 000 Zellen einschließlich toter Zellen aufgenommen werden. Alternativ können die Daten eine Minute nach der Einleitung der Analyse aufgenommen werden.

$$\text{Zellviabilität} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzahl der aufgenommenen Zellen}} \times 100$$

Der CV75-Wert (siehe Abschnitt 13), d. h. eine Konzentration, die 75 % des THP-1-Zellüberlebens (25 % Zytotoxizität) zeigt, wird anhand der log-linearen Interpolation mit der folgenden Gleichung berechnet:

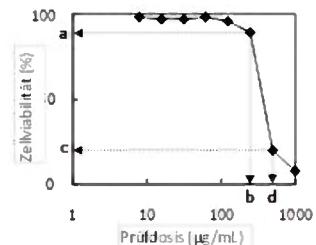
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Dabei gilt:

a ist der Mindestwert der Zellviabilität über 75 %

c ist der Höchstwert der Zellviabilität unter 75 %

b und d sind die Konzentrationen, die den Wert der Zellviabilität a bzw. c zeigen



Weitere Ansätze zur Ableitung von CV75 können angewandt werden, solange demonstriert wird, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (z. B. durch Testen der Leistungsstoffe).

CD86/CD54-Expressionsmessung

Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

20. Das geeignete Lösungsmittel/Vehikel (Kochsalzlösung, Medium oder DMSO; siehe Abschnitt 14) wird verwendet, um die Prüfchemikalien zu lösen oder stabil zu verteilen. Die Prüfchemikalien werden zuerst auf die Konzentration verdünnt, die dem 100-fachen (für Kochsalzlösung oder Medium) oder 500-fachen (für DMSO) von $1,2 \times \text{CV75}$ entspricht, der im *Test zur Dosisfindung* bestimmt wurde (siehe Abschnitt 19). Wenn der CV75 nicht

bestimmt werden kann (d. h. wenn keine ausreichende Zytotoxizität im *Test zur Dosisfindung* beobachtet werden kann), sollte die höchste lösliche oder stabil verteilte Konzentration der Prüfchemikalie, die mit jedem Lösungsmittel/Vehikel vorbereitet wird, als Ausgangskonzentration verwendet werden. Bitte beachten Sie, dass die endgültige Konzentration in der Platte 5000 µg/ml (im Falle von Kochsalzlösung oder Medium) oder 1000 µg/ml (im Falle von DMSO) nicht überschreiten sollte. Dann werden 1,2-fache serielle Verdünnungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel/Vehikel hergestellt, um die Stammlösungen zu erhalten (acht Konzentrationen von $100 \times 1,2 \times CV75$ bis $100 \times 0,335 \times CV75$ (für Kochsalzlösung oder Medium) oder von $500 \times 1,2 \times CV75$ bis $500 \times 0,335 \times CV75$ (für DMSO)), die in der h-CLAT-Methode geprüft werden sollen (siehe DB-ALM-Protokoll Nr. 158 für ein Beispiel eines Dosierungsschemas). Die Stammlösungen werden dann im Kulturmedium 50-fach (für Kochsalzlösung oder Medium) oder 250-fach (für DMSO) weiter verdünnt (Arbeitslösungen). Diese Arbeitslösungen werden schließlich für die Exposition mit einem weiteren endgültigen zweifachen Verdünnungsfaktor in der Platte verwendet. Wenn die Ergebnisse die in den Abschnitten 29 und 30 beschriebenen Akzeptanzkriterien zur Zellviabilität nicht erfüllen, kann der *Test zur Dosisfindung* wiederholt werden, um einen präziseren CV75 zu bestimmen. Bitte beachten Sie, dass nur Platten mit 24 Mulden für die CD86/CD54-Expressionsmessung verwendet werden können.

21. Die Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird wie in Abschnitt 16 beschrieben vorbereitet. Die bei der h-CLAT-Methode verwendete Positivkontrolle ist DNCB (siehe Abschnitt 11), für die Stammlösungen in DMSO vorbereitet und wie für die Stammlösungen in Abschnitt 20 beschrieben verdünnt werden. DNCB sollte als Positivkontrolle für die *CD86/CD54-Expressionsmessung* mit einer endgültigen Konzentration in der Platte verwendet werden (normalerweise 4,0 µg/ml). Um eine Konzentration von 4,0 µg/ml DNCB in der Platte zu erhalten, wird eine Stammlösung von 2 mg/ml DNCB in DMSO vorbereitet und weiter 250-fach mit dem Kulturmedium in eine Arbeitslösung von 8 µg/ml verdünnt. Alternativ könnte auch der CV75 von DNCB, der in jeder Prüfeinrichtung bestimmt wird, als Positivkontrollenkonzentration verwendet werden. Andere geeignete Positivkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Bei Positivkontrollen sollte die endgültige Einzelkonzentration in der Platte 5000 µg/ml (im Falle von Kochsalzlösung oder Medium) oder 1000 µg/ml (im Falle von DMSO) nicht überschreiten. Die Durchlaufakzeptanzkriterien entsprechen denen, die für die Prüfchemikalien beschrieben werden (siehe Abschnitt 29), ausgenommen für das letzte Akzeptanzkriterium, da die Positivkontrolle mit einer einzelnen Konzentration geprüft wird.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

22. Für jede Prüfchemikalie und jeden Kontrollstoff ist ein Experiment erforderlich, um eine Vorhersage zu ermitteln. Jedes Experiment besteht aus mindestens zwei unabhängigen Durchläufen für die *CD86/CD54-Expressionsmessung* (siehe Abschnitte 26–28). Jeder unabhängige Durchlauf wird an einem anderen Tag bzw. am selben Tag durchgeführt, vorausgesetzt, dass für jeden Durchlauf: a) unabhängige frische Stammlösungen und Arbeitslösungen der Prüfchemikalie und Antikörperlösungen vorbereitet werden und b) unabhängig geerntete Zellen verwendet werden (d. h. Zellen, die aus verschiedenen Kulturkolben entnommen werden); Zellen können jedoch aus derselben Passage stammen. Prüfchemikalien und Kontrollstoffe, die als Arbeitslösungen (500 µl) vorbereitet wurden, werden mit 500 µl der suspesierten Zellen (1×10^6 Zellen) im Verhältnis von 1:1 gemischt und die Zellen werden $24 \pm 0,5$ Stunden wie in den Abschnitten 20 und 21 beschrieben inkubiert. In jedem Durchlauf reicht ein einziges Replikat für jede Konzentration der Prüfchemikalie und des Kontrollstoffs aus, da eine Vorhersage in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen ermittelt wird.

Zellfärbung und Analyse

23. Nach einer Expositionsduer von mindestens $24 \pm 0,5$ Stunden werden die Zellen von einer Platte mit 24 Mulden in Probenröhren gegeben, mithilfe von Zentrifugierung gesammelt und dann zweimal mit 1 ml Färtepuffer gewaschen (wenn erforderlich können zusätzliche Waschschritte durchgeführt werden). Nach dem Waschen werden die Zellen mit 600 µl Blockierungslösung blockiert (Färtepuffer mit 0,01 % (w/v) Globulin (Cohn-Faktion II, III, human; SIGMA, #G2388-10G oder ähnliches)) und bei 4°C 15 Minuten lang inkubiert. Nach der Blockierung werden die Zellen in drei Aliquote von je 180 µl in eine Platte mit gewölbtem Boden und 96 Mulden oder ein Mikroröhrchen aufgeteilt.
24. Nach der Zentrifugierung werden die Zellen mit 50 µl der mit FITC markierten anti-CD86-, anti-CD54- oder Maus-IgG1-Antikörper (Isotyp) bei 4°C 30 Minuten lang gefärbt. Die im h-CLAT DB-ALM Protokoll Nr. 158 (18) beschriebenen Antikörper sollten verwendet werden, indem sie 3:25 v/v (für CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klon: Fun-1)) oder 3:50 v/v (für CD54 (DAKO, #F7143; Klon: 6.5B5) und IgG1 (DAKO, #X0927)) mit Färtepuffer verdünnt werden. Diese Antikörperferverdünnungsfaktoren wurden von den Entwicklern des Tests als diejenigen definiert, die den besten Rauschabstand bieten. Nach Erfahrung der Testentwickler ist die Fluoreszenzintensität der Antikörper normalerweise zwischen verschiedenen Chargen konsistent. Benutzer können jedoch erwägen, die Antikörper unter den Bedingungen im eigenen Labor zu titrieren, um die besten Gebrauchskonzentrationen zu definieren. Andere mit Fluorochrom markierte anti-CD86- und/oder anti-CD54-Antikörper

können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse wie mit FITC konjugierte Antikörper liefern, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 1.2. Anzumerken ist, dass die Änderung des Klons oder des Lieferanten der Antikörper, wie dies im h-CLAT DB-ALM Protokoll Nr. 158 (18) beschrieben wird, die Ergebnisse beeinträchtigen kann. Nach dem zwei- oder mehrfachen Waschen mit 150 µl Färbepuffer werden die Zellen in Färbepuffer resuspendiert (z. B. 400 µl) und die PI-Lösung (z. B. 20 µl, um eine endgültige Konzentration von 0,625 µg/ml zu erhalten) oder eine andere Zytotoxizitätsmarkerlösung (siehe Abschnitt 18) wird hinzugefügt. Die Expressionswerte von CD86 und CD54 sowie die Zellviabilität werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

25. Die Expression von CD86 und CD54 wird mithilfe der Durchflusszytometrie mit dem Aufnahmekanal FL-1 analysiert. Auf der Grundlage der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) werden die relative Fluoreszenzintensität (RFI) von CD86 und CD54 für Positivkontrollzellen (ctrl) und chemisch behandelte Zellen nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$RFI = \frac{MFI \text{ chemisch behandelte Zelle} - MFI \text{ chemisch behandelte Isotypkontrollzellen}}{MFI \text{ mit Lösungsm./ Vehikel beh. Kontrollz.} - MFI \text{ mit Lösungsm./ Vehikel beh. Isotypkontrollz.}} \times 100$$

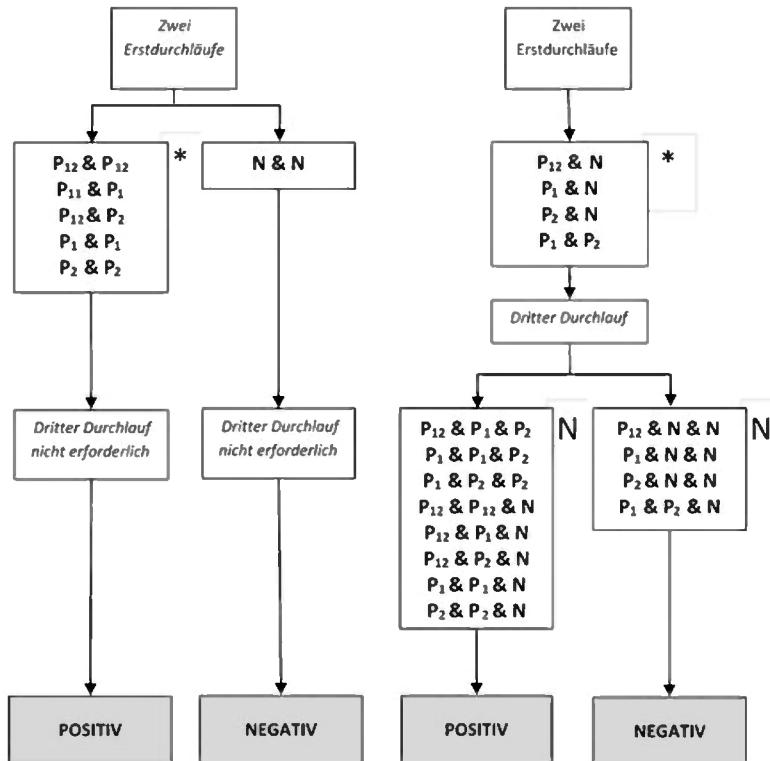
Die Zellviabilität aus den Isotypkontrollzellen (ctrl) (die mit Maus-IgG1-Antikörpern (Isotyp) gefärbt werden) wird ebenfalls nach der in Abschnitt 19 beschriebenen Gleichung berechnet.

Vorhersagemodell

26. Bei der CD86/CD54-Expressionsmessung wird jede Prüfchemikalie in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen geprüft, um eine einzige Vorhersage abzuleiten (POSITIV oder NEGATIV). Eine h-CLAT-Vorhersage gilt als POSITIV, wenn mindestens eine der folgenden Bedingungen in 2 von 2 oder in mindestens 2 von 3 unabhängigen Durchläufen erfüllt ist, andernfalls wird die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV angesehen (Abbildung 1):

- Die RFI von CD86 ist bei jeder geprüften Konzentration gleich oder größer als 150 % (mit einer Zellviabilität $\geq 50\%$);
 - die RFI von CD54 ist bei jeder geprüften Konzentration gleich oder größer als 200 % (mit einer Zellviabilität $\geq 50\%$).
27. Auf dieser Grundlage ist die h-CLAT-Vorhersage als POSITIV anzusehen, wenn die ersten zwei Durchläufe positiv für CD86 und/oder positiv für CD54 waren; ein dritter Durchlauf ist dann nicht mehr erforderlich. Analog ist die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV anzusehen (unter angemessener Berücksichtigung der Bestimmungen in Abschnitt 30), wenn die ersten zwei Durchläufe für beide Marker negativ sind; ein dritter Durchlauf ist dann nicht mehr erforderlich. Wenn die ersten zwei Durchläufe jedoch für mindestens einen der Marker nicht konkordant ist (CD54 oder CD86), dann ist ein dritter Durchlauf erforderlich und die endgültige Vorhersage basiert auf dem Mehrheitsergebnis der drei individuellen Durchläufe (d. h. 2 von 3). In dieser Hinsicht ist zu beachten, dass ein dritter Durchlauf erforderlich ist, wenn zwei unabhängige Durchläufe durchgeführt werden und einer nur für CD86 (nachfolgend „P₁“ genannt) und der andere nur für CD54 (nachfolgend „P₂“ genannt) positiv ist. Wenn dieser dritte Durchlauf für beide Marker negativ ist (nachfolgend „N“ genannt), dann wird die h-CLAT-Vorhersage als NEGATIV angesehen. Wenn der dritte Durchlauf andererseits für einen der Marker (P₁ oder P₂) oder für beide Marker (nachfolgend „P₁₂“ genannt) positiv ist, dann ist die h-CLAT-Vorhersage als POSITIV anzusehen.

Abb. 1: Bei der h-CLAT-Methode verwendetes Vorhersagemodell. Eine h-CLAT-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Nummern 7 und 8 der Allgemeinen Einleitung in Betracht gezogen werden.



P₁: Durchlauf mit nur CD86 positiv; P₂: Durchlauf mit nur CD54 positiv; P₁₂: Durchlauf mit CD86 und CD54 positiv; N: Durchlauf mit weder CD86 noch CD54 positiv.

*Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den ersten beiden Durchläufen unabhängig von der Reihenfolge, in der sie ermittelt wurden.

#Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den drei Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten zwei Durchläufen, wie im obigen Kästchen dargestellt, aber spiegeln nicht die Reihenfolge wider, in der sie ermittelt wurden.

28. Für die Prüfchemikalien, die mit h-CLAT als POSITIV vorhergesehen wurden, können optional zwei effektive Konzentrationswerte (EC) bestimmt werden, EC150 für CD86 und EC200 für CD54, d. h. die Konzentration, bei der die Prüfchemikalien eine RFI von 150 bzw. 200 induzierten. Diese EC-Werte können jedoch bei Verwendung im Rahmen von integrierten Ansätzen wie IATA (4) (5) (6) (7) (8) möglicherweise auch zur Bewertung der Sensibilisierungspotenz beitragen (9). Sie können mithilfe der folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/(A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/(A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

Dabei gilt:

A_{conc} ist die niedrigste Konzentration in µg/ml mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

B_{conc} ist die höchste Konzentration in µg/ml mit RFI < 150 (CD86) oder 200 (CD54)

A_{RFI} ist die RFI bei der niedrigsten Konzentration mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

B_{RFI} ist die RFI bei der höchsten Konzentration mit RFI > 150 (CD86) oder 200 (CD54)

Zum Zwecke der präziseren Ableitung der EC150- und EC200-Werte können drei unabhängige Durchläufe für die *CD86/CD54-Expressionsmessung* erforderlich sein. Die endgültigen EC150- und EC200-Werte werden dann als Mittelwert der aus den drei unabhängigen Durchläufen berechneten ECs bestimmt. Wenn nur zwei der drei unabhängigen Durchläufe die Kriterien für Positivität (siehe Abschnitte 26–27) erfüllen, wird der höhere EC150 oder EC200 der zwei berechneten Werte übernommen.

Akzeptanzkriterien

29. Bei der Verwendung der h-CLAT-Methode (22) (27) sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden.

- Die Zellviabilitäten der Medium- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollten höher als 90 % sein.
- Bei der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle sollten die RFI-Werte von CD86 und CD54 die positiven Kriterien nicht überschreiten (CD86 RFI ≥ 150 % und CD54 RFI ≥ 200 %). Die RFI-Werte der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle werden berechnet, indem die in Abschnitt 25 beschriebene Formel verwendet wird („MFI der Chemikalie“ sollte durch „MFI des Lösungsmittels/Vehikels“ ersetzt werden und „MFI des Lösungsmittels/Vehikels“ sollte durch „MFI der (Medium-)Kontrolle“ ersetzt werden).
- Bei den Medium- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollte das MFI-Verhältnis von CD86 und CD54 zur Isotypkontrolle >105 % betragen.

- Bei der Positivkontrolle (DNCB) sollten die RFI-Werte von CD86 und CD54 die Positivkriterien ($CD86\text{ RFI} \geq 150$ und $CD54\text{ RFI} \geq 200$) erfüllen und die Zellviabilität sollte mehr als 50 % betragen.
 - Für die Prüfchemikalie sollte die Zellviabilität in mindestens vier geprüften Konzentrationen in jedem Durchlauf mehr als 50 % betragen.
30. Negative Ergebnisse sind nur für Prüfchemikalien mit einer Zellviabilität von weniger als 90 % bei der höchsten geprüften Konzentration zulässig (d. h. $1,2 \times CV75$ gemäß dem in Abschnitt 20 beschriebenen seriellen Verdünnungsschema). Wenn die Zellviabilität bei $1,2 \times CV75$ 90 % oder mehr beträgt, sollte das negative Ergebnis verworfen werden. In einem solchen Fall wird empfohlen, die Dosiswahl durch Wiederholung der CV75-Bestimmung zu präzisieren. Es sollte beachtet werden, dass bei der Verwendung von 5000 µg/ml in Kochsalzlösung (oder Medium oder anderen Lösungsmitteln/Vehikeln), 1000 µg/ml in DMSO oder der höchsten löslichen Konzentration als maximale Prüfkonzentration einer Prüfchemikalie ein negatives Ergebnis auch dann akzeptabel ist, wenn die Zellviabilität über 90 % liegt.

Prüfbericht

31. Der Prüfbericht sollte 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, log K_{ow}, 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 dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);

- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

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 dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

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, $\log K_{ow}$, 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 dem Test, 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- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel 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 Kontroll-Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfrichtlinie genannten verwendet werden und soweit verfügbar;
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen:

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Beschreibung des verwendeten Tests;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);
- die verwendete Durchflusszytometrie (z. B. Modell), einschließlich der Geräteeinstellungen, Globulin, Antikörper und verwendeten Zytotoxizitätsmarker;
- das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung des Tests durch Prüfen der Leistungsstoffe) und das angewandte Verfahren

zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung des Tests im Zeitverlauf, z. B. historische Kontrolldaten und/oder Daten zu historischen Reaktivitätstests.

Validitätskriterien

- Zellviabilität, MFI- und RFI-Werte aus der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität und RFI-Werte aus der Positivkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität aller geprüften Konzentrationen der geprüften Chemikalie.

Prüfverfahren

- Anzahl der vorgenommenen Durchläufe;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationen und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)
- Expositionsdauer (falls abweichend von der empfohlenen);
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

Ergebnisse

- Tabellierung der Daten, einschließlich CV75 (falls anwendbar), individueller geometrischer MFI, RFI, Zellviabilitätswerte, EC150/EC200-Werte (falls anwendbar) für die Prüfchemikalie und für die Positivkontrolle in jedem Durchlauf und eine Anzeige der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;
- Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

Erörterung der Ergebnisse

- Erörterung der anhand der h-CLAT-Methode erhaltenen Ergebnisse;

- Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428–437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Verfügbar unter: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318–1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333–1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez 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 Parmacol.* 63, 489–504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371–379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R,

- Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337–351.
- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355–2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150–60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Verfügbar unter: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Verfügbar unter: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599–609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683–1969.

- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81–88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23ff. Verfügbar unter: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70–82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, Frankreich, 2005, 96 ff.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fünfte überarbeitete Fassung. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T,

Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27–35.

Anlage 1.1

DEFINITIONEN

Genauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen 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).

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 (22).

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

CV75: Die geschätzte Konzentration, die 75 % Zellviabilität zeigt.

EC150: die Konzentrationen, die die RFI-Werte von 150 in der CD86-Expression zeigen

EC200: die Konzentrationen, die die RFI-Werte von 200 in der CD54-Expression zeigen

Durchflusszytometrie: eine zytometrische Technik, bei der Zellen, die in einem Fluid suspendiert sind, einzeln durch einen Lichtstrahl fließen, das in für die Zellen und ihre Komponenten typischen Muster gestreut ist; Zellen werden häufig mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet, damit das Licht zuerst absorbiert und dann in geänderten Frequenzen ausgestrahlt wird.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder

des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

Mediumkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems enthält. Diese Probe wird mit prüfchemikalienbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel/Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

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

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.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems 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.

Prähaptene: Chemikalien, die erst nach einer abiotischen Umwandlung zu Sensibilisatoren werden

Prohaptene: Chemikalien, die ihr Hautsensibilisierungspotenzial erst durch eine enzymatische Bioaktivierung erlangen

Relative Fluoreszenzintensität (RFI): Relative Werte der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in chemisch behandelten Zellen im Vergleich zu MFI in mit Lösungsmittel/Vehikel behandelten Zellen.

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).

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 (21).

Durchlauf: Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Sie ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (21).

Färbepuffer: Eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1 % Rinderserumalbumin.

Lösungsmittel/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft 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 (21).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen im natürlichen Zustand oder durch ein Produktionsverfahren, die einen Zusatzstoff induzieren, der zur Erhaltung seiner Stabilität erforderlich ist, sowie Verunreinigungen, die aus dem verwendeten Prozess stammen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die getrennt sein können, ohne die Stabilität des Stoffes zu beeinträchtigen oder seine Zusammensetzung zu ändern.

Prüfchemikalie: Stoffe oder Gemische, die mit dieser Methode geprüft wurden.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (23).

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

Gültiger Test: Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern nur im Verhältnis zu einem definierten Zweck (21).

Anlage 1.2

LEISTUNGSSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete h-CLAT-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Leistungsstoffe korrekt ermitteln und die CV75-, EC150- und EC200-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 betrafen die Erhältlichkeit der Chemikalien im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger In-vivo-Referenzdaten und die Verfügbarkeit hochwertiger In-vitro-Daten aus der h-CLAT-Prüfmethode. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für die h-CLAT-Methode verfügbar (3) (14).

Tabelle 1: Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit mit der h-CLAT-Methode

Leistungsstoffe	CAS-Nr.	Aggregatzustand	In-vivo-Vorhersage ¹	CV75 Referenz Bereich in µg/ml ²	h-CLAT-Ergebnisse für CD86 (EC150-Referenzbereich in µg/ml) ²	h-CLAT-Ergebnisse für CD54 (EC200-Referenzbereich in µg/ml) ²
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	Sensibilisator (extrem)	2–12	positiv (0,5–10)	positiv (0,5–15)
4-Phenylenediamin	106-50-3	fest	Allergen (stark)	5–95	positiv (< 40)	negativ (> 1,5) ³
Nickelsulfat	10101-97-0	fest	Allergen (mäßig)	30–500	positiv (< 100)	positiv (10–100)
2-Mercaptbenzothiazol	149-30-4	fest	Allergen (mäßig)	30–400	negativ (> 10) ³	positiv (10–140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	flüssig	Allergen (schwach)	> 20	negativ (> 5) ³	positiv (< 250)
Imidazolidinylharnstoff	39236-46-9	fest	Sensibilisator (schwach)	25–100	positiv (20–90)	positiv (20–75)
Isopropanol	67-63-0	flüssig	Nichtsensibilisator	> 5000	negativ (> 5000)	negativ (> 5000)
Glyzerin	56-81-5	flüssig	Nichtsensibilisator	> 5000	negativ (> 5000)	negativ (> 5000)

Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nichsensibilisator	1500–5000	negativ (> 5000)	negativ (> 5000)
4-Aminobenzoësäure	150-13-0	fest	Nichsensibilisator	> 1000	negativ (> 1000)	negativ (> 1000)

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

¹ Die In-vivo-Gefahren- und (Potenz-)Vorhersagen basieren auf Daten des LLNA (3) (14). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (24).

² Gestützt auf historische beobachtete Werte (13) (25).

³ Historisch gesehen wurde eine Mehrzahl von negativen Ergebnissen für diesen Marker erhalten und deshalb ist ein negatives Ergebnis zu erwarten. Der vorgegebene Bereich wurde auf Basis der wenigen beobachteten historischen positiven Ergebnisse definiert. Falls ein positives Ergebnis ermittelt wird, sollte der EC-Wert innerhalb des eingetragenen Referenzbereichs liegen.

Anlage 2

IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: U937-AKTIVIERUNGSTEST MIT ZELL LINIEN (U-SENSTM)

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

1. Der U-SENSTM-Test quantifiziert die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) (d. h. CD86) in der humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie U937 nach einer Exposition gegenüber Allergenen (1). Die gemessenen Expressionswerte des Zelloberflächenmarkers CD86 in der Zelllinie U937 werden dann zur Unterstützung der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren verwendet.
2. Der U-SENSTM-Test wurde in einer von L’Oreal koordinierten Validierungsstudie (2) und anschließend in einer unabhängigen Begutachtung durch den EURL ECVAM wissenschaftlichen beratenden Ausschuss (ESAC) (3) des Referenzlabors der europäischen Union für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) bewertet. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Behörden und Interessenträgern wurde U-SENSTM von EURL ECVAM (4) empfohlen, um als Teil eines IATA verwendet zu werden, um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zum Zweck der Gefahreneinstufung und Etikettierung zu unterstützen. In ihrem Leitfaden zur Berichterstattung strukturierter Ansätze zur Datenintegration und individuellen Informationsquellen, die innerhalb von IATA für die Hautsensibilisierung verwendet werden, diskutiert die OECD derzeit eine Anzahl an Fallstudien, die verschiedene Teststrategien und Vorhersagemodelle beschreiben. Einer der anders definierten Ansätze basiert auf dem U-SENS-Test (5). Beispiele für die Verwendung der U-SENSTM-Daten in Kombination mit anderen Informationen, einschließlich historischer Daten und vorhandener gültiger menschlicher Daten (6), werden auch an anderer Stelle in der Literatur aufgeführt (4) (5) (7).
3. Der U-SENSTM-Test erwies sich als übertragbar auf Labore mit Erfahrung auf dem Gebiet der Zellkulturtechniken und der Durchfluszytometrieanalyse haben. Der Grad der Reproduzierbarkeit, der bei der Prüfmethode erwartet werden kann, liegt in der Größenordnung von 90 % und 84 % innerhalb und zwischen Labors (8). Die Ergebnisse der

Validierungsstudie (8) und veröffentlichter Studien (1) weisen insgesamt darauf hin, dass die Genauigkeit bei der Unterscheidung von Hautsensibilatoren (d. h. UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) gegenüber Nichtsensibilisatoren 86 % (N = 166) bei einer Empfindlichkeit von 91 % (118/129) und einer Spezifität von 65 % (24/37) im Vergleich zu den Ergebnissen des LLNA beträgt. Verglichen mit menschlichen Ergebnissen beträgt die Genauigkeit bei der Unterscheidung von Hautallergenen (d. h. UN-GHS/CLP Kat.1) von Nichtsensibilisatoren 77 % (N = 101) mit einer Sensitivität von 100 % (58/58) und einer Spezifität von 47 % (20/43). Im Vergleich zu LLNA ist bei falsch negativen Vorhersagen mit dem U-SENS™ die Chance größer, dass Chemikalien mit geringer bis mittlerer Hautsensibilisierungspotenz betroffen sind (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1B), als Chemikalien mit hoher Hautsensibilisierungspotenz (d. h. UN-GHS/CLP-Unterkategorie 1A) (1) (8) (9). Zusammenfassend geben diese Informationen an, wie nützlich sich der U-SENS™-Test bei der Beteiligung an der Identifikation von Hautsensibilisierungsgefahren erweist. Jedoch sind die Genauigkeitswerte, die hier für U-SENS™ 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 7 und 8 der allgemeinen Einleitung 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 Menschen nicht vollständig widerspiegeln.

4. Auf der Basis der aktuell verfügbaren Daten wurde gezeigt, dass der U-SENS™-Test auf Prüfchemikalien angewandt werden kann (einschließlich Zutaten von Kosmetika, z. B. Konservierungsmittel, Tenside, Aktivstoffe, Farbstoffe), die eine Vielfalt an organischen Funktionsgruppen, physikalisch-chemischen Eigenschaften, Hautsensibilisierungspotenzial (wie in In-vivo-Studien festgelegt) und das Spektrum der Wirkmechanismen, das für seine Assoziation mit der Hautsensibilisierung bekannt ist, abdecken (d. h. Michael-Akzeptor, Schiff-Basisbildung, Acylübertragungsmittel, Substitution nukleophil bimolekular [SN2] oder nukleophile aromatische Substitution [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Der U-SENS™-Test gilt für Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder vom Lösungsmittel/Vehikel in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösungsmittel/Vehikel bilden (siehe Abschnitt 13). Im Datensatz eingetragene Chemikalien, die Prähaptene (d. h. durch Oxidierung aktivierte Stoffe) oder Prohaptene (d. h. Stoffe, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, wie beispielsweise über P450-Enzyme) sind, wurden von U-SENS™ korrekt vorhergesagt (1) (10). Membranschädigende Stoffe können aufgrund einer nichtspezifischen Erhöhung der CD86-Expression zu falsch positiven Ergebnissen führen, da 3 von 7 falsch positiven Ergebnissen in Bezug auf die In-vivo-Referenzeinstufung

Tenside waren (1). Solche positiven Ergebnisse mit Tensiden sollen mit Vorsicht betrachtet werden, während negative Ergebnisse mit Tensiden weiterhin genutzt werden können, um die Identifizierung der Prüfchemikalie als Nichtsensibilisator zu unterstützen. Fluoreszierende Prüfchemikalien können mit U-SENSTM (1) bewertet werden. Dennoch beeinträchtigen stark fluoreszierende Prüfchemikalien, die mit derselben Wellenlänge ausstrahlen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Propidiumjodid (PI) die durchflusszytometrische Erkennung und können daher nicht korrekt mithilfe von mit FITC-konjugierten Antikörpern (potenziell falsch negativ) oder PI (Viabilität nicht messbar) bewertet werden. In einem solchen Fall können andere mit Fluorochrom markierte Antikörper bzw. andere Zytotoxizitätsmarker verwendet werden, solange aufgezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse liefern wie die mit FITC markierten Antikörper oder PI (siehe Abschnitt 18), z. B. durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Angesichts der vorstehenden Ausführungen sollten positive Ergebnisse mit Tensiden und negative Ergebnisse mit stark fluoreszierenden Prüfchemikalien im Kontext der angegebenen Grenzen und in Verbindung mit anderen Informationsquellen im Rahmen von IATA interpretiert werden. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit des U-SENSTM-Tests bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte sie bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

5. Der U-SENSTM-Test unterstützt, wie bereits oben 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. Es sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich, vorzugsweise auf der Grundlage von Humandaten, um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse von U-SENSTM möglicherweise zur Potenzbewertung herangezogen werden können.
6. Definitionen sind Anlage 2.1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Der U-SENSTM-Test ist ein In-vitro-Test, der Änderungen der Expression von CD86-Zelloberflächenmarkern auf einer humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie, U937-Zellen, nach einer Exposition von 45 ± 3 Stunden gegenüber der Prüfchemikalie quantifiziert. Der Oberflächenmarker CD86 ist ein typischer Marker der U937-Aktivierung. CD86 ist dafür bekannt, ein ko-stimulierendes Molekül zu sein, das eine monozytische Aktivierung nachahmen kann, die eine wichtige Rolle beim T-Zellen-Priming spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern von CD86 werden anhand der Durchflusszytometrien

nach einer Zellfärbung, die typischerweise mit Antikörpern erfolgt, die mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert wurden, gemessen. Die Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls zur gleichen Zeit durchgeführt (z. B. durch die Verwendung von PI), um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression von CD86-Zelloberflächenmarkern bei Konzentrationen unterhalb des zytotoxischen Werts auftritt. Der Stimulationsindex (S.I.) des CD86-Zelloberflächenmarkers im Vergleich zur Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet (siehe Abschnitt 19), um die Unterscheidung zwischen Allergenen und Nichsensibilisatoren zu unterstützen.

NACHWEIS DER KOMPETENZ

8. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 2.2 aufgeführten Leistungsstoffe in Übereinstimmung mit bewährten In-vitro-Verfahren nachweisen (11). Darüber hinaus sollten Testbenutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätstests (siehe Abschnitt 11) und mit den positiven und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 15-16) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit des Tests in ihrem Labor mit der Zeit aufrechterhalten wird.

VERFAHREN

9. Dieser Test basiert auf dem U-SENS™ DataBase-Dienst zu Alternativmethoden für Tierversuche (DB-ALM) Protokoll Nr. 183 (12). Die Standardarbeitsanweisungen (SOP) sollten bei der Umsetzung und Verwendung des U-SENS™-Tests im Labor angewandt werden. Es kann ein automatisiertes System zur Durchführung von U-SENS™ verwendet werden, wenn aufgezeigt werden kann, dass es ähnliche Ergebnisse liefert, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Nachfolgend werden die wichtigsten Komponenten und Verfahren für den U-SENS™-Test beschrieben.

Vorbereitung der Zellen

10. Die humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie U937 (13) sollte zur Durchführung des U-SENS™-Tests verwendet werden. Zellen (Klon CRL1593.2) sollten aus einer gut qualifizierten Zellbank wie der American Type Culture Collection entnommen werden.

11. U937-Zellen werden bei 37 °C unter 5 % CO₂ und einer befeuchteten Atmosphären in einem mit 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereicherten RPMI-1640-Medium (vollständiges Medium) kultiviert. U937-Zellen werden regelmäßig alle 2–3 Tage bei einer Dichte von 1,5 bzw. 3×10^5 Zellen/ml passagiert. Die Zelldichte sollte 2×10^6 Zellen/ml nicht überschreiten und die Zellviabilität, die anhand des Trypanblau-Ausschlusses gemessen wird, sollte ≥ 90 % betragen (nach dem Auftauen nicht an der ersten Passage anwenden). Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollte jede Charge von Zellen, FCS oder Antikörpern qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Der Reaktivitätstest der Zellen sollte mithilfe der Positivkontrolle, Picrylsulfonsäure (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure: TNBS) (CASRN 2508-19-2, ≥ 99 % Reinheit) und der Negativkontrolle Milchsäure (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % Reinheit) mindestens eine Woche nach dem Auftauen durchgeführt werden. Beim Reaktivitätstest sollten sechs endgültige Konzentrationen für jede der 2 Kontrollen geprüft werden (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml und LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). In vollständigem Medium gelöste TNBS sollte eine positive und von der Konzentration abhängige Wirkung auf CD86 zeigen (z. B. wenn auf eine positive Konzentration, CD86 S.I. ≥ 150, eine Konzentration mit steigendem CD86 S.I. folgt), und in vollständigem Medium gelöste LA sollte eine negative Wirkung auf CD86 zeigen (siehe Abschnitt 21). Nur die Chargen von Zellen, welche den Reaktivitätstest zwei Mal bestanden haben, dürfen für den Test verwendet werden. Zellen können bis zu sieben Wochen nach dem Auftauen gewonnen werden. Die Anzahl an Passagen sollte 21 nicht übersteigen. Der Reaktivitätstest sollte gemäß den in den Abschnitten 18–22 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.
12. Zur Prüfung werden die U937-Zellen bei einer Dichte von entweder 3×10^5 Zellen/ml oder 6×10^5 Zellen/ml ausgesät und in Kulturkolben 2 bzw. 1 Tag lang vorgezüchtet. Andere vorgezüchtete Bedingungen als diejenigen, die oben beschrieben werden, können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung vorliegt und wenn gezeigt werden kann, dass ähnliche Ergebnisse geliefert werden, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Am Testtag werden die Zellen, die aus dem Kulturkolben geerntet wurden, mit einem frischen Kulturmedium mit 5×10^5 Zellen/ml neu angesetzt. Dann werden die Zellen in einer flachen Platte mit 96 Mulden mit 100 µl verteilt (endgültige Zelldichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/Mulde).

Vorbereitung der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

13. Die Beurteilung der Löslichkeit wird vor dem Test vorgenommen. Zu diesem Zweck werden die Prüfchemikalien bei einer Konzentration von 50 mg/ml in vollständigem Medium als erste Lösungsmitteloption oder Dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99 % Reinheit) als zweite

Lösungsmittel-/Vehikeloption gelöst oder stabil verteilt, wenn die Prüfchemikalie nicht im Lösungsmittel/Vehikel des vollständigen Mediums löslich ist. Beim Test wird die Prüfchemikalie auf eine endgültige Konzentration von 0,4 mg/ml im vollständigen Medium gelöst, wenn die Chemikalie in diesem Lösungsmittel/Vehikel löslich ist. Wenn die Chemikalie nur in DMSO löslich ist, wird die Chemikalie bei einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst. Andere als die oben beschriebenen Lösungsmittel/Vehikel können verwendet werden, wenn eine ausreichende wissenschaftliche Begründung gegeben ist. Die Stabilität der Prüfchemikalie im endgültigen Lösungsmittel/Vehikel sollte berücksichtigt werden.

14. Die Prüfchemikalien sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Da kein Test zur Dosisfindung durchgeführt wird, sollten für den ersten Durchlauf 6 endgültige Konzentrationen (1, 10, 20, 50, 100 und 200 µg/ml) im entsprechenden Lösungsmittel/Vehikel entweder in vollständigem Medium oder in 0,4 % DMSO im Medium geprüft werden. Bei den nachfolgenden Durchläufen sollten, ausgehend von den 0,4 mg/ml im vollständigen Medium oder 50 mg/ml in DMSO-Lösungen der Prüfchemikalie, mindestens 4 Arbeitslösungen mithilfe des entsprechenden Lösungsmittels/Vehikels vorbereitet werden (d. h. mindestens 4 Konzentrationen). Die Arbeitslösungen werden schließlich für die Behandlung verwendet, indem eine gleiche Menge der U937-Zellsuspension (siehe Abschnitt 11 oben) zum Volumen der Arbeitslösung in der Platte hinzugefügt wird, um eine weitere zweifache Verdünnung zu erhalten (12). Die Konzentrationen (mindestens 4 Konzentrationen) für weitere Durchläufe werden auf der Grundlage der individuellen Ergebnisse sämtlicher vorheriger Durchläufe gewählt (8). Die nutzbaren endgültigen Konzentrationen sind 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 µg/ml. Die höchste endgültige Konzentration beträgt 200 µg/ml. Wenn ein CD86 positiver Wert bei 1 µg/ml beobachtet wird, dann werden 0,1 µg/ml bewertet, um die Konzentration der Prüfchemikalie zu finden, die CD86 nicht über dem positiven Schwellenwert induziert. Bei jedem Durchlauf wird der EC150 (Konzentration, bei der eine Chemikalie den positiven Schwellenwert für CD86 von 150 % erreicht, siehe Abschnitt 19) berechnet, falls eine positive Konzentrationswirkung für CD86 beobachtet wird. Wo die Prüfchemikalie eine positive CD86-Wirkung induziert, die nicht von der Konzentration abhängig ist, ist eine Berechnung von EC150 eventuell nicht relevant, wie dies im U-SENSTM DB-ALM Protokoll Nr. 183 (12) beschrieben wird. Bei jedem Durchlauf wird CV70 (Konzentration, bei der eine Chemikalie die Zytotoxizitätsschwelle von 70 % erreicht, siehe Abschnitt 19) wo immer möglich berechnet (12). Um den Konzentrationswirkungseffekt der CD86-Steigung zu untersuchen sollten Konzentrationen aus den verwendbaren Konzentrationen gleichmäßig zwischen EC150 (oder der höchsten CD86 negativen, nicht zytotoxischen Konzentration) und CV70 (oder der

höchsten zulässigen Konzentration, d. h. 200 µg/ml) verteilt gewählt werden. Es sollten pro Durchlauf mindestens 4 Konzentrationen geprüft werden, wobei zu Vergleichszwecken mindestens 2 Konzentrationen mit den vorherigen Durchläufen übereinstimmen sollten.

15. Die im U-SENST™-Test verwendete Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle ist ein vollständiges Medium (für gelöste oder stabil verteilte Prüfchemikalien) (siehe Abschnitt 4) oder 0,4 % DMSO in vollständigem Medium (für in DMSO gelöste oder stabil verteilte Prüfchemikalien).
16. Die im U-SENST™-Test verwendete Positivkontrolle ist TNBS (siehe Abschnitt 11), die in vollständigem Medium vorbereitet wird. TNBS sollte als Positivkontrolle für die CD86-Expressionsmessung mit einer endgültigen einzelnen Konzentration in der Platte (50 µg/ml) verwendet werden, die > 70 % der Zellviabilität erbringt. Um eine Konzentration von 50 µg/ml TNBS in der Platte zu erhalten, wird eine Stammlösung von 1M (d. h. 293 mg/ml) TNBS im vollständigen Medium vorbereitet und 2930-fach mit dem vollständigen Medium in einer Arbeitslösung von 100 µg/ml verdünnt. Milchsäure (LA, CAS 50-21-5) sollte bei 200 µg/ml in vollständigem Medium gelöst als Negativkontrolle verwendet werden (von einer Stammlösung von 0,4 mg/ml). In jeder Platte jedes Durchlaufs werden drei Replikate der unbehandelten Kontrolle, Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle, Positiv- und Negativkontrollen im vollständigen Medium vorbereitet (12). Andere geeignete Positivkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen. Die Akzeptanzkriterien des Durchlaufs entsprechen denen, die für die Prüfchemikalie beschrieben wurden (siehe Abschnitt 12).

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

17. Die Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle oder die Arbeitslösungen, die in den Abschnitten 14–16 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 12). Die behandelten Platten werden dann 45 ± 3 Stunden bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert. Vor der Inkubation werden die Platten mit einer semipermeablen Membran versiegelt, um eine Verdampfung von flüchtigen Prüfchemikalien und eine Kreuzkontaminierung zwischen den mit den Prüfchemikalien behandelten Zellen zu vermeiden (12).

Zellfärbung

18. Nach einer Expositionszeit von 45 ± 3 Stunden werden die Zellen in eine V-förmige Mikrotiterplatte übertragen und durch Zentrifugierung gesammelt. Die Löslichkeitsinterferenz ist definiert als Kristalle oder Tropfen, die 45 ± 3 Stunden nach der Behandlung (vor der Zellfärbung) unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Tenside werden entsorgt und die verbleibenden Zellen werden einmal mit $100 \mu\text{l}$ eiskalter mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 5 % fetalem Kälberserum (Färbepuffer) gewaschen. Nach der Zentrifugierung werden die Zellen mit $100 \mu\text{l}$ Färbepuffer resuspensierte und mit $5 \mu\text{l}$ (z. B. $0,25 \mu\text{g}$) mit FITC markierten anti-CD86- oder Maus-IgG1-Antikörpern (Isotyp) bei 4°C 30 Minuten lang vor Licht geschützt. Die im U-SENS™ DB-ALM Protokoll Nr. 183 (12) beschriebenen Antikörper sollten verwendet werden (für CD86: BD-PharMingen #555657 Klon: Fun-1, oder Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klon: BU63; und für IgG1: BD-PharMingen #555748, oder Caltag/Invitrogen # GM4992). Nach Erfahrung der Testentwickler ist die Fluoreszenzintensität der Antikörper normalerweise zwischen verschiedenen Chargen konsistent. Andere Klone oder Lieferanten der Antikörper, welche den Reaktivitätstest bestanden haben, können für den Test verwendet werden (siehe Abschnitt 11). Benutzer können jedoch erwägen, die Antikörper unter den Bedingungen im eigenen Labor zu titrieren, um die beste Gebrauchskonzentration zu definieren. Andere Erkennungssystem, z. B. mit Fluorochrom markierte anti-CD86-Antikörper, können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass sie ähnliche Ergebnisse wie mit FITC konjugierte Antikörper liefern, beispielsweise durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2. Die Zellen werden zweimal mit $100 \mu\text{l}$ Färbepuffer und einmal mit $100 \mu\text{l}$ einer eiskalten PBS gewaschen und anschließend in eiskalter PBS resuspensierte (z. B. $125 \mu\text{l}$ für Proben, die manuell Röhrchen für Röhrchen analysiert werden, oder $50 \mu\text{l}$ mithilfe einer Autosampler-Platte) und PI-Lösung wird hinzugefügt (endgültige Konzentration von $3 \mu\text{g}/\text{ml}$). Andere Zytotoxizitätsmarker wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) oder Trypanblau können verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass die alternativen Farbstoffe ähnliche Ergebnisse liefern wie PI, zum Beispiel durch Testen der Leistungsstoffe in Anlage 2.2.

Durchflusszytometrieanalyse

19. Die Expressionswerte von CD86 und die Zellviabilität werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Zellen werden in einem Größen- (FSC) und Granularitäts- (SSC) Dot-Plot angezeigt, der auf eine log-Skala eingestellt ist, um die Population eindeutig in einem ersten Gate R1 zu identifizieren und die Verschmutzung zu beseitigen. Für jede Mulde wird eine Sollgesamtmenge von 10 000 Zellen in Gate R1 aufgenommen. Zellen vom selben R1-Gate werden in einem FL3- oder FL4 / SSC-Dot-Plot angezeigt. Lebensfähige Zellen werden dargestellt, indem ein zweites Gate R2 platziert wird, das die Population von

Propidiumjodid-negativen Zellen auswählt (FL3- oder FL4-Kanal). Die Zellviabilität kann anhand der folgenden Gleichung über das Zytometeranalyseprogramm berechnet werden. Wenn die Zellviabilität gering ist, könnten bis zu 20 000 Zellen einschließlich toter Zellen aufgenommen werden. Alternativ können die Daten eine Minute nach der Einleitung der Analyse aufgenommen werden.

$$\text{Zellviabilität} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzahl der aufgenommenen Zellen}} \times 100$$

Die Prozentzahl der FL1-positiven Zellen wird dann unter diesen lebensfähigen Zellen gemessen, die in R2 eingeschlossen sind (innerhalb von R1). Die Zelloberflächenexpression von CD86 wird in einem FL1- / SSC-Dot-Plot analysiert, das auf lebensfähigen Zellen eingeschlossen ist (R2).

Bei den vollständiges Medium/IgG1-Mulden befindet sich der Analysemarker in der Nähe der Hauptpopulation, sodass die Kontrollen des vollständigen Mediums einen IgG1 im Sollbereich von 0,6 bis 0,9 % aufweisen.

Die Farbinterferenz wird definiert als eine Verlagerung des mit FITC markierten IgG1-Dot-Plots (IgG1 FL1 geo. Mittelw. S.I. $\geq 150\%$).

Der Stimulationsindex (S.I.) von CD86 für Kontrollzellen (unbehandelt oder in 0,4 % DMSO) und chemisch behandelte Zellen wird gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$S.I. = \frac{\% \text{ von } CD86^+ \text{ behandelte Zellen} - \% \text{ von } IgG1^+ \text{ behandelte Zellen}}{\% \text{ von } CD86^+ \text{ Kontrollzellen} - \% \text{ von } IgG1^+ \text{ Kontrollzellen}} \times 100$$

% von IgG1⁺ unbehandelte Kontrollzellen: bezeichnet als Prozentzahl der FL1-positiven IgG1-Zellen, die mit dem Analysemarker (zulässiger Bereich von $\geq 0,6\%$ und $< 1,5\%$, siehe Abschnitt 22) unter den lebensfähigen unbehandelten Zellen definiert wurden.

% von IgG1⁺/CD86⁺ Kontrolle/behandelte Zellen: bezeichnet als Prozentzahl von FL1-positiven IgG1/CD86-Zellen, die ohne Verlagerung des Analysemarkers unter den lebensfähigen Kontroll-/behandelten Zellen gemessen werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

20. Die folgenden Parameter werden im U-SENSTM-Test berechnet: CV70-Wert, d. h. eine Konzentration, die 70 % des U937-Zellüberlebens (30 % Zytotoxizität) zeigt, und der EC150-Wert, d. h. die Konzentration, bei der die Prüfchemikalien einen CD86-Stimulationsindex (S.I.) von 150 % induzierten.

CV70 wird anhand der log-linearen Interpolation mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

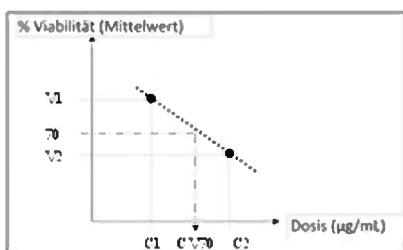
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Dabei gilt:

V1 ist der Mindestwert der Zellviabilität über 70 %

V2 ist der Höchstwert der Zellviabilität unter 70 %

C1 und C2 sind die Konzentrationen, die den Wert der Zellviabilität V1 bzw. V2 zeigen.



Weitere Ansätze zur Ableitung von CV70 können angewandt werden, solange demonstriert wird, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (z. B. durch Testen der Leistungsstoffe).

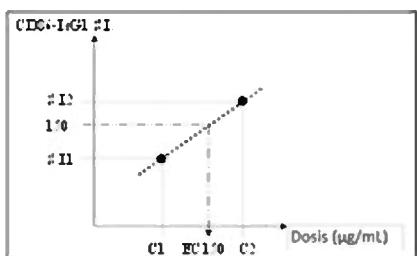
EC150 wird anhand der log-linearen Interpolation mithilfe der folgenden Gleichung berechnet:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Dabei gilt:

C1 ist die höchste Konzentration in µg/ml mit einem CD86 S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 ist die niedrigste Konzentration in µg/ml mit einem CD86 S.I. ≥ 150 % (S.I. 2)



Die EC150- und CV70-Werte wurden für jeden

- Durchlauf berechnet: die individuellen EC150- und CV70-Werte wurden als Werkzeuge zur Untersuchung des Konzentrationswirkungseffekts der CD86-Steigung verwendet (siehe Abschnitt 14),
- gestützt auf die durchschnittlichen Lebensfähigkeiten wird der CV70-Gesamtwert bestimmt (12),
- gestützt auf die durchschnittlichen S.I. der CD86-Werte wird der EC150-Gesamtwert für die mit U-SENS™ als POSITIV vorhergesagte Prüfchemikalie bestimmt (siehe Abschnitt 21) (12).

Vorhersagemodell

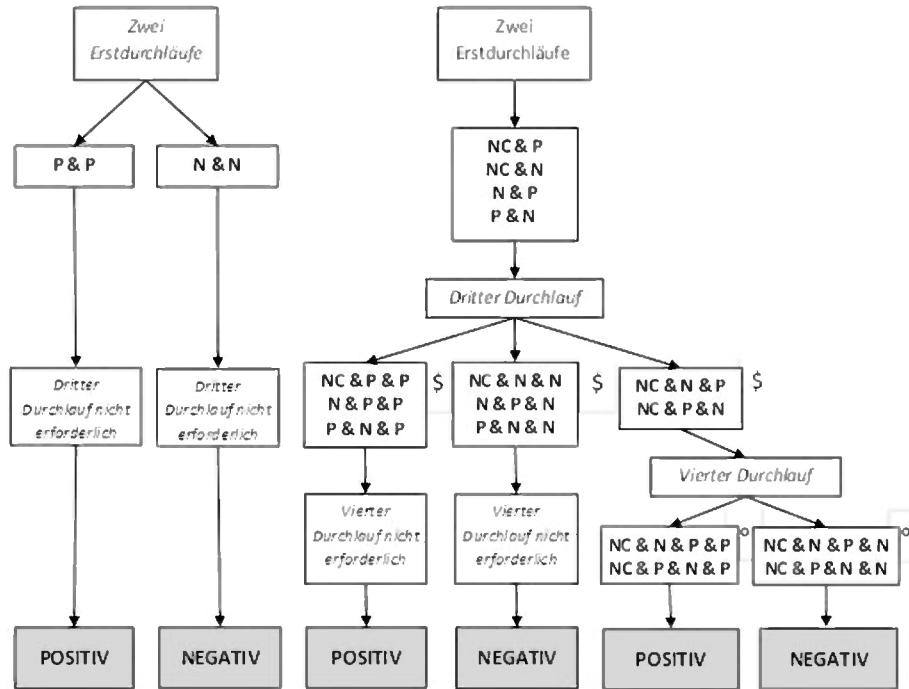
21. Bei der CD86-Expressionsmessung wird jede Prüfchemikalie in mindestens vier Konzentrationen und in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen geprüft (an unterschiedlichen Tagen durchgeführt), um eine einzelne Vorhersage abzuleiten (NEGATIV oder POSITIV).

- Die individuelle Schlussfolgerung eines U-SENS™-Durchlaufs wird als Negativ (nachfolgend als „N“ bezeichnet) angesehen, wenn der S.I. von CD86 bei allen nicht-zytotoxischen Konzentrationen weniger als 150 % beträgt (Zellviabilität $\geq 70\%$) und wenn keine Beeinträchtigung beobachtet wird (Zytotoxizität, Löslichkeit: siehe Abschnitt 18 oder Farbe: siehe Abschnitt 19 unabhängig der nicht-zytotoxischen Konzentrationen, bei denen die Beeinträchtigung erkannt wird). In allen anderen Fällen: S.I. von CD86 höher als oder gleich 150 % und/oder Beeinträchtigungen beobachtet, dann

wird die individuelle Schlussfolgerung eines U-SENSTM-Durchlaufs als Positiv (nachfolgend als „P“ bezeichnet) angesehen.

- Eine U-SENSTM-Vorhersage wird als NEGATIV angesehen, wenn mindestens zwei unabhängige Durchläufe negativ (N) sind (Abbildung 1). Wenn die ersten zwei Durchläufe beide negativ (N) sind, dann wird die U-SENSTM-Vorhersage als NEGATIV angesehen und ein dritter Durchlauf ist nicht erforderlich.
- Eine U-SENSTM-Vorhersage wird als POSITIV angesehen, wenn mindestens zwei unabhängige Durchläufe positiv (P) sind (Abbildung 1). Wenn die ersten zwei Durchläufe beide positiv (P) sind, dann wird die U-SENSTM-Vorhersage als POSITIV angesehen und ein dritter Durchlauf ist nicht erforderlich.
- Da kein Test zur Dosisfindung durchgeführt wird, gibt es eine Ausnahme, wenn der S.I. von CD86 im ersten Durchlauf höher als oder gleich 150 % bei ausschließlich der höchsten, nicht-zytotoxischen Konzentration ist. Der Durchlauf wird dann als NICHT SCHLÜSSIG angesehen und zusätzliche Konzentrationen (zwischen der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration und der niedrigsten nicht-zytotoxischen Konzentration – siehe Abschnitt 20) sollten in zusätzlichen Durchläufen geprüft werden. Wenn ein Durchlauf als nicht schlüssig identifiziert wird, sollten mindestens 2 zusätzliche Durchläufe vorgenommen werden; ein vierter Durchlauf ist erforderlich, falls die Durchläufe 2 und 3 nicht konkordant sind (N und/oder P unabhängig voneinander) (Abbildung 1). Folgedurchläufe werden auch dann als positiv angesehen, wenn nur eine nicht-zytotoxische Konzentration ein CD86 von 150 % oder mehr ergibt, da die Konzentrationseinstellung für die spezifische Prüfchemikalie angepasst wurde. Die endgültige Vorhersage basiert auf dem Mehrheitsergebnis der drei oder vier individuellen Durchläufe (d. h. 2 von 3 oder 2 von 4) (Abbildung 1).

Abb. 1: Beim U-SENSTM-Test verwendetes Vorhersagemodell. Eine U-SENSTM-Vorhersage sollte im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen der Nummer 4 sowie der Nummern 7, 8 und 9 der allgemeinen Einleitung in Betracht gezogen werden



N: Durchlauf ohne Feststellung von CD86 als positiv oder mit Interferenz;

P: Durchlauf mit Feststellung von CD86 als positiv und/oder mit Interferenz(en);

NC: Nicht schlüssig. Erster Durchlauf als nicht schlüssig, wenn CD86 nur bei der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration positiv ist;

#: Eine nicht schlüssige individuelle Schlussfolgerung, die ausschließlich dem ersten Durchlauf zugeschrieben wird, führt automatisch zum Erfordernis eines dritten Durchlaufs, um eine Mehrheit von entweder Positiven (P) oder Negativen (N) Schlussfolgerungen in mindestens 2 von 3 unabhängigen Durchläufen zu erzielen.

\$: Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den drei Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten zwei Durchläufen, die im obigen Kästchen dargestellt sind.

°: Die Kästchen zeigen die relevanten Kombinationen der Ergebnisse aus den vier Durchläufen auf der Grundlage der Ergebnisse aus den ersten drei Durchläufen, die im obigen Kästchen dargestellt sind.

Akzeptanzkriterien

22. Bei der Verwendung des U-SENSTM-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden (12).

- Am Ende des Expositionszeitraums von 45 ± 3 Stunden musste die Hauptviabilität der dreifach ausgefertigten unbehandelten U937-Zellen $> 90\%$ sein und es wurde keine

Verschiebung der CD86-Expression beobachtet. Die basale CD86-Expression unbehandelter U937-Zellen musste im Bereich von $\geq 2\%$ und $\leq 25\%$ liegen.

- Wenn DMSO als ein Lösungsmittel verwendet wird, dann wird die Gültigkeit der DMSO-Vehikelkontrolle durch die Berechnung eines DMSO S.I. im Vergleich zu unbehandelten Zellen bewertet und die Viabilität der dreifach ausgeführten Zellen musste $> 90\%$ liegen. Die DMSO-Vehikelkontrolle ist gültig, wenn der Mittelwert des dreifach ausgeführten CD86 S.I. kleiner als 250 % des Mittelwerts des dreifach ausgeführten CD86 S.I. von unbehandelten U937-Zellen war.
- Die Durchläufe werden als gültig angesehen, wenn mindestens zwei von drei IgG1-Werte von unbehandelten U937-Zellen in den Bereich von $\geq 0,6\%$ und $< 1,5\%$ gefallen sind.
- Die gleichzeitig geprüfte Negativkontrolle (Milchsäure) wird als gültig angesehen, wenn mindestens zwei der drei Replikate negativ (CD86 S.I. $< 150\%$) und nicht-zytotoxisch waren (Zellviabilität $\geq 70\%$).
- Die Positivkontrolle (TNBS) wurde als gültig angesehen, wenn mindestens zwei der drei Replikate positiv (CD86 S.I. $\geq 150\%$) und nicht-zytotoxisch waren (Zellviabilität $\geq 70\%$).

Prüfbericht

23. Der Prüfbericht sollte 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, im verfügbaren Umfang;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;

- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

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, im verfügbaren Umfang;
- Molekulargewicht oder scheinbares Molekulargewicht im Fall von Gemischen/Polymeren mit bekannter Zusammensetzung oder andere für die Durchführung der Studie relevante Informationen;
- Behandlung vor dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

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 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 dem Test, 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- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:

- Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel 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 Kontroll-Lösungsmittel/Vehikel als die in der Prüfrichtlinie genannten verwendet werden und soweit verfügbar;
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Beschreibung des verwendeten Prüfprotokolls;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurden);
- die verwendete Durchfluszytometrie (z. B. Modell), einschließlich der Geräteeinstellungen, Antikörper und verwendeten Zytotoxizitätsmarker;

- das angewandte Verfahren zum Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Durchführung des Tests durch Prüfen der Leistungsstoffe) und das angewandte Verfahren zum Nachweis der reproduzierbaren Leistung des Tests im Zeitverlauf, z. B. historische Kontroldaten und/oder Daten zu historischen Reaktivitätstests.

Validitätskriterien

- Zellviabilität und CD86 S.I.-Werte aus der Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität und S.I.-Werte aus der Positivkontrolle im Vergleich zu den Validitätsbereichen;
- Zellviabilität aller geprüften Konzentrationen der geprüften Chemikalie.

Prüfverfahren

- Anzahl der vorgenommenen Durchläufe;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationen und angewandte Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend)
- Expositionsdauer;
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

Ergebnisse

- Tabellierung der Daten, einschließlich CV70 (falls anwendbar), S.I., Zellviabilitätswerte, EC150-Werte (falls anwendbar) für die Prüfchemikalie und für die Positivkontrolle in jedem Durchlauf und eine Anzeige der Einstufung der Prüfchemikalie gemäß dem Vorhersagemodell;
- Beschreibung etwaiger sonstiger relevanter Beobachtungen, falls zutreffend.

Erörterung der Ergebnisse

- Erörterung der anhand des U-SENS™-Tests erhaltenen Ergebnisse;

- Analyse der Prüfergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern sonstige relevante Informationen vorliegen.

Schlussfolgerungen

LITERATURHINWEISE

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENSTM test method Validation Study Report. Verfügbar unter: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENSTM test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Verfügbar unter: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Verfügbar unter: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373–382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683–1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Final%20Draft%20GIVIMP.pdf).
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33ff. Verfügbar unter: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Vereinte Nationen (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sechste überarbeitete Fassung, New York und Genf: United Nations Publications. Verfügbar unter: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse

Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Verfügbar unter: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETO_C_2003-TR87.pdf.

Anlage 2.1

DEFINITIONEN

Genauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen 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 eines Tests (14).

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 (15).

CD86-Konzentrationswirkung: Es liegt eine Konzentrationsabhängigkeit (oder Konzentrationswirkung) vor, wenn auf eine positive Konzentration (CD86 S.I. ≥ 150) eine Konzentration mit einem steigenden CD86 S.I. folgt.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

CV70: Die geschätzte Konzentration, die 70 % Zellviabilität zeigt.

Verschiebung: Eine Verschiebung wird definiert durch i) den korrigierten %CD86⁺-Wert des unbehandelten Kontrollreplikats 3 beträgt weniger als 50 % des Mittelwerts des korrigierten %CD86⁺ Werts der unbehandelten Kontrollreplikate 1 und 2; und ii) der korrigierte %CD86⁺-Wert des Negativkontrollreplikats 3 beträgt weniger als 50 % des Mittelwerts des korrigierten %CD86⁺ Werts der Negativkontrollreplikate 1 und 2.

EC150: die geschätzten Konzentrationen, die 150 % S.I. der CD86-Expression aufzeigen.

Durchflusszytometrie: eine zytometrische Technik, bei der Zellen, die in einem Fluid suspendiert sind, einzeln durch einen Lichtstrahl fließen, das in für die Zellen und ihre Komponenten typischen Muster gestreut ist; Zellen werden häufig mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet, damit das Licht zuerst absorbiert und dann in geänderten Frequenzen ausgestrahlt wird.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

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

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens ≥ 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.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems 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.

Prähaptene: Chemikalien, die durch abiotische Transformation zu Allergenen werden, z. B. durch Oxidierung.

Prohaptene: Chemikalien, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, um ihr Hautsensibilisierungspotenzial auszuschöpfen.

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 umfasst die Einbeziehung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Tests (14).

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 (14).

Durchlauf: Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (14).

S.I.: Stimulationsindex. Relative Werte der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität in chemisch behandelten Zellen im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (14).

Färbepuffer: Eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit 5 % fetalem Kälberserum.

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen im natürlichen Zustand oder durch ein Produktionsverfahren, die einen Zusatzstoff induzieren, der zur Erhaltung seiner Stabilität erforderlich ist, sowie Verunreinigungen, die aus dem verwendeten Prozess stammen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die getrennt sein können, ohne die

Stabilität des Stoffes zu beeinträchtigen oder seine Zusammensetzung zu ändern.

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

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (16).

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

Gültiger Test: Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern im Verhältnis zu einem definierten Zweck (14).

Anlage 2.2

LEISTUNGSSTOFFE

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zu Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete U-SENSTM-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Stoffe korrekt ermitteln und die CV70- und EC150-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 betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, und dass qualitativ hochwertige In-vivo-Referenzdaten sowie qualitativ hochwertige In-vitro-Daten aus dem U-SENSTM-Test verfügbar sind. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für den U-SENSTM-Test verfügbar (1) (8).

Tabelle 1: Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim U-SENSTM-Test

Leistungsstoffe	CAS-Nr.	Aggregatzustand	In-vivo-Vorhersage¹	U-SENSTM Lösungsmittel/Vehikel	U-SENSTM CV70 Referenz Bereich in µg/ml²	U-SENSTM EC150 Referenz Bereich in µg/ml²
4-Phenylenediamin	106-50-3	fest	Allergen (stark)	Vollständiges Medium ³	< 30	positiv (≤ 10)
Picrylschwefelsäure	2508-19-2	flüssig	Allergen (stark)	Vollständiges Medium	> 50	positiv (≤ 50)
Diethylmaleat	141-05-9	flüssig	Allergen (mäßig)	DMSO	10–100	positiv (≤ 20)
Resorcin	108-46-3	fest	Allergen (mäßig)	Vollständiges Medium	> 100	positiv (≤ 50)
Zimtalkohol	104-54-1	fest	Allergen (schwach)	DMSO	> 100	positiv (10–100)
4-Allylanisol	140-67-0	flüssig	Sensibilisator (schwach)	DMSO	> 100	positiv (< 200)
Saccharin	81-07-2	fest	Nichtsensibilisator	DMSO	> 200	negativ (> 200)
Glyzerin	56-81-5	flüssig	Nichtsensibilisator	Vollständiges Medium	> 200	negativ (> 200)

Milchsäure	50-21-5	flüssig	Nichtsensibilisator	Vollständiges Medium	> 200	negativ (> 200)
Salicylsäure	69-72-7	fest	Nichtsensibilisator	DMSO	> 200	negativ (> 200)

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

¹ Die Vorhersagen der In-vivo-Gefahr (und Potenz) basieren auf LLNA-Daten (1) (8). Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (17).

² Basierend auf den historischen beobachteten Werten (1) (8).

³ Vollständiges Medium RPMI-1640-Medium, ergänzt durch 10 % fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (8).

Anlage 3**IN-VITRO-HAUTSENSIBILISIERUNG: IL-8 LUC-TEST****AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN**

1. Im Gegensatz zu Tests, die die Expression von Zelloberflächenmarkern analysieren, quantifiziert der IL8-Luc-Test die Änderungen des IL-8-Expressions, ein Zytokin im Zusammenhang mit der Aktivierung dendritischer Zellen (DC). In der von THP-1 abgeleiteten IL-8-Reporter-Zelllinie (THP-G8, etabliert aus der humanen akuten monozytischen Leukämiezelllinie THP-1) wird die IL-8-Expression nach der Exposition gegenüber Allergenen gemessen (1). Die Expression der Luciferase wird dann verwendet, um bei der Unterscheidung zwischen Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren zu helfen.
2. Der IL-8-Luc-Test wurde in einer Validierungsstudie (2), das vom Japanischen Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden (JaCVAM), dem **Ministerium für Wirtschaft, Handel und Industrie** (METI) und der Japanischen Gesellschaft für **Alternativen zu Tierversuchen** (JSAAE) durchgeführt wurde, bewertet und anschließend einer unabhängigen Begutachtung (3) unter der Aufsicht des JaCVAM und des Ministeriums für Gesundheit, Arbeit und Wohlstand (MHLW) mit Unterstützung der **Internationalen Kooperation für alternative Prüfmethoden** (ICATM) unterzogen. Unter Berücksichtigung sämtlicher verfügbarer Nachweise und Informationen von Behörden und Interessenträgern wurde der IL-8-Luc-Test als Teil eines IATA als nützlich angesehen, zwischen Allergenen und Nichtsensibilisatoren zum Zweck der Gefahreneinstufung und Etikettierung zu unterscheiden. Beispiele für die Verwendung von IL-8-Luc-Test-Daten in Kombination mit anderen Informationen werden in der Literatur beschrieben (4) (5) (6).
3. Der IL-8-Luc-Test stellte sich als übertragbar auf Labore heraus, die mit Zellkulturen und Luciferasemessungen Erfahrung haben. Laborreproduzierbarkeiten lagen zwischen 87,7 % bzw. 87,5 % (2). Daten, die in der Validierungsstudie (2) und anderen veröffentlichten Arbeiten (1) (6) erzeugt wurden, zeigen, dass der IL-8-Luc-Test im Vergleich zu LLNA 118 von 143 Chemikalien als positiv oder negativ und 25 Chemikalien als nicht schlüssig eingestuft hat und die Genauigkeit des IL-8-Luc-Tests bei der Unterscheidung von Hautallergenen (UN-GHS/CLP Kat. 1) von Nichtsensibilisatoren (UN-GHS/CLP Nr. Kat.) beträgt 86 % (101/118) mit einer Sensitivität von 96 % (92/96) und einer Spezifität von 41 % (9/22). Außer den unten beschriebenen Stoffen außerhalb des Anwendungsbereichs

(Abschnitt 5) stufte der IL-8-Luc-Test 113 von 136 Chemikalien als positiv oder negativ und 23 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit des IL-8-Luc-Tests liegt bei 89 % (101/113) mit einer Sensitivität von 96 % (92/96) und einer Spezifität von 53 % (9/17). Unter Anwendung der in Urbisch et al. zitierten Humandaten (7) stufte der IL-8-Luc-Test 76 von 90 Chemikalien als positiv oder negativ und 14 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit liegt bei 80 % (61/76), die Sensitivität bei 93 % (54/58) und die Spezifität bei 39 % (7/18). Außer den Stoffen außerhalb des Anwendungsbereichs stufte der IL-8-Luc-Test 71 von 84 Chemikalien als positiv oder negativ und 13 Chemikalien als nicht schlüssig ein und die Genauigkeit liegt bei 86 % (61/71) mit einer Sensitivität von 93 % (54/58) und einer Spezifität von 54 % (7/13). Falsch negative Vorhersagen mit dem IL-8-Luc-Test treten wahrscheinlicher bei Chemikalien auf, die eine niedrige/mittlere Hautsensibilisierungspotenz (UN-GHS/CLP Unterkategorie 1B) aufweisen als bei denjenigen mit einer hohen Potenz (UN-GHS/CLP Unterkategorie 1A) (6). Zusammen unterstützen die Informationen die Zweckdienlichkeit des IL-8-Luc-Tests bei der Identifizierung von Hautsensibilisierungsgefahren. Jedoch sollte die Genauigkeit, die hier für den IL-8-Luc-Test als eigenständiger Test angegeben wird, in Kombination mit anderen Informationsquellen im Rahmen eines IATA sowie gemäß den Bestimmungen unter Nummer 7 und 8 oben in der Allgemeinen Einleitung betrachtet werden. Darüber hinaus sollte bei der Bewertung von Tests zur Hautsensibilisierung ohne Tierversuche beachtet werden, dass der LLNA sowie andere Tierversuche die Situation bei Menschen nicht vollständig widerspiegeln.

4. Auf der Grundlage der gegenwärtig verfügbaren Daten über den IL-8-Luc-Test wurde nachgewiesen, dass er bei Prüfchemikalien, die eine Vielzahl an organischen Funktionsgruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzial (wie in In-vivo-Studien festgestellt) und physikalisch-chemischen Eigenschaften abdecken, anwendbar ist (2) (6).
5. Obwohl der IL-8-Luc-Test X-VIVO™ 15 als Lösungsmittel verwendet, bewertete es Chemikalien mit einem Log $K_{ow} > 3,5$ und diejenigen mit einer Wasserlöslichkeit von ungefähr 100 µg/ ml wie von der EPI Suite™ berechnet korrekt und seine Leistung bei der Erkennung von Allergenen mit schlechter Wasserlöslichkeit ist besser als die des IL-8-Luc-Tests, das Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet (2). Negative Ergebnisse für Prüfchemikalien, die nicht bei 20 mg/ml gelöst werden, können falsch negative Ergebnisse hervorrufen, da sie nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind. Deshalb sollten negative Ergebnisse für diese Chemikalien nicht berücksichtigt werden. Bei der Validierungsstudie gab es eine hohe Falsch-Negativ-Rate für Anhydride. Darüber hinaus können Prohaptene (Stoffe, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern) und Prähaptene (Stoffe, die durch

Oxidation aktiviert werden) aufgrund der eingeschränkten Stoffwechselfähigkeit der Zelllinie (8) und der Versuchsbedingungen falsch negative Ergebnisse hervorrufen. Obwohl negative Ergebnisse für mutmaßliche Prä-/Prohaptene jedoch mit Vorsicht interpretiert werden sollten, hat der IL-8-Luc-Test 11 von 11 Prähaptene, 6/6 Prohaptene und 6/8 Prä-/Prohaptene im IL-8-Luc-Test-Datensatz korrekt eingestuft (2). Auf der Grundlage der kürzlichen umfassenden Begutachtung von drei Tests ohne Tierversuche (DPRA, KeratinoSens™ und h-CLAT) zur Erkennung von Prä- und Prohapteten (9) und basierend auf der Tatsache, dass THP-G8-Zellen im IL-8-Luc-Test verwendet werden, wird eine Zelllinie von THP-1 abgeleitet, die in h-CLAT verwendet wird; der IL-8-Luc-Test kann auch dazu beitragen, die Sensitivität von Tests ohne Tierversuche zur Erkennung von Prä- und Prohapteten in der Kombination anderer Tests zu steigern. Bisher geprüfte Tenside führten unabhängig von ihrem Typ (z. B. kationisch, anionisch oder nichtionisch) zu (falsch) positiven Ergebnissen. Schließlich können Chemikalien, die mit Luciferase interferieren, die Aktivität/Messung durcheinander bringen, was zu einer offensichtlichen Hemmung oder einer erhöhten Lumineszenz führt (10). Beispielweise wurde eingetragen, dass Phytoöstrogenkonzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ die Luminesenzsignale in anderen auf Luciferase basierenden Reporter-Gen-Tests aufgrund der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens stören. Infolgedessen muss die Luciferase-Expression, die bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder Verbindungen, die vermutlich eine mit Phytoöstrogen vergleichbare Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens bewirken, sorgfältig untersucht werden (11). Basierend auf den obigen Aussagen liegen Tenside, Anhydride und Chemikalien, die Luciferase beeinträchtigen, außerhalb des Anwendungsbereichs dieser Tests. In Fällen, in denen die Nichtanwendbarkeit des IL-8-Luc-Tests bei anderen spezifischen Kategorien von Prüfchemikalien nachgewiesen wird, sollte der Test bei diesen spezifischen Kategorien nicht verwendet werden.

6. Der IL-8-Luc-Test unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Unterscheidung von Hautallergenen und Nichtsensibilisatoren. Weitere Arbeiten, vorzugsweise basierend auf menschlichen Daten, sind erforderlich, um zu bestimmen, ob die Ergebnisse von IL-8-Luc zur Potenzbewertung beitragen können, wenn sie in Kombination mit anderen Informationsquellen berücksichtigt werden.
7. Definitionen sind Anlage 3.1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Der IL-8-Luc-Test nutzt eine humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1, die von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) erhalten wurde. Mit dieser

Zelllinie etablierte die Abteilung für Dermatologie der Tohoku University School of Medicine eine von THP-1 abgeleitete IL-8-Reporter-Zelllinie, THP-G8, die die Luciferase-Gene „Stable Luciferase Orange (SLO)“ und „Stable Luciferase Red (SLR)“ unter der Kontrolle von IL-8 bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Trägern beherbergt (1). Dies ermöglicht die quantitative Messung der Luciferase-Geninduktion durch Lumineszenzerkennung unter Verwendung von bekannten lichterzeugenden Luciferase-Substraten als Indikator für die Aktivität des IL-8 und GAPDH in Zellen nach Exposition gegenüber sensibilisierenden Chemikalien.

9. Das zweifarbig Prüfsystem besteht aus einer orange emittierenden Luciferase (SLO; $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12) für die Genexpression des IL-8-Trägers sowie einer rot emittierenden Luciferase (SLR; $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13) für die Genexpression des internen Kontrollträgers GAPDH. Die zwei Luciferasen strahlen bei der Reaktion mit Leuchtkäfer-d-Luciferin verschiedene Farben aus und ihre Lumineszenz wird gleichzeitig in einer einstufigen Reaktion gemessen, indem die Emission von der Testmischung mithilfe eines optischen Filters geteilt wird (14) (Anlage 3.2).
10. THP-G8-Zellen werden 16 Stunden lang mit der Prüfchemikalie behandelt und danach wird die SLO-Luciferase-Aktivität (SLO-LA) gemessen, die die IL-8-Trägeraktivität widerspiegelt, sowie die SLR-Luciferase-Aktivität (SLR-LA), die die GAPDH-Trägeraktivität widerspiegelt. Um die Abkürzungen leicht verständlich zu machen, wenden SLO-LA und SLR-LA als IL8LA bzw. GAPLA bezeichnet. Tabelle 1 bietet eine Beschreibung der Ausdrücke im Zusammenhang mit der Luciferase-Aktivität im IL-8-Luc-Test. Die gemessenen Werte werden verwendet, um das normalisierte IL8LA ($n\text{IL8LA}$) zu berechnen, das das Verhältnis von IL8LA zu GAPLA ist; die Induktion von $n\text{IL8LA}$ (Ind-IL8LA), das das Verhältnis des arithmetischen Mittels der in vierfacher Ausfertigung gemessenen Wert des $n\text{IL8LA}$ von mit einer Prüfchemikalie behandelten THP-G8-Zellen zu den Werten des $n\text{IL8LA}$ der unbehandelten THP-G8-Zellen ist; und die Hemmung von GAPLA (Inh-GAPLA), das das Verhältnis des arithmetischen Mittels der in vierfacher Ausfertigung gemessenen Werte des GAPLA von mit einer Prüfchemikalie behandelten THP-G8-Zellen zu den Werten des GAPLA der unbehandelten THP-G8-Zellen ist und als Indikator für die Zytotoxizität verwendet wird.

Tabelle 1: Beschreibung der Ausdrücke im Zusammenhang mit der Luciferase-Aktivität im IL-8-Luc-Test

Abkürzungen	Definition
GAPLA	SLR-Luciferase-Aktivität, die die GAPDH-Trägeraktivität widerspiegelt
IL8LA	SLO-Luciferase-Aktivität, die die IL-8-Trägeraktivität widerspiegelt

nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	IL8LA von mit Chemikalien behandelten THP-G8-Zellen / nIL8LA von unbehandelten Zellen
Inh-GAPLA	GAPLA von mit Chemikalien behandeltem THP-G8 / GAPLA von unbehandelten Zellen
CV05	Die niedrigste Konzentration der Chemikalie, bei der Inh-GAPLA < 0,05 wird.

11. Es stehen Leistungsnormen (15) zur Verfügung, die die Validierung geänderter In-vitro-IL-8-Luciferase-Tests ähnlich dem IL-8-Luc-Test sowie die rechtzeitige Anpassung der OECD-Prüfrichtlinie 442E für deren Einbeziehung ermöglichen. Die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß OECD wird nur für Tests garantiert, die gemäß diesen Leistungsnormen validiert wurden, sofern diese Tests von der OECD überprüft und in die Prüfrichtlinie 442E aufgenommen wurden (16).

NACHWEIS DER KOMPETENZ

12. Vor der routinemäßigen Verwendung des unter dieser Anlage zur Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Laboratorien ihre technische Kompetenz anhand der zehn in Anlage 3.3 aufgeführten Leistungsstoffe in Übereinstimmung mit bewährten In-vitro-Verfahren nachweisen (17). Darüber hinaus sollten Testbenutzer eine historische Datenbank der mit den Reaktivitätstests (siehe Abschnitt 15) und mit den positiven und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (siehe Abschnitte 21–24) erzeugten Daten pflegen und diese Daten nutzen, um zu bestätigen, dass die Reproduzierbarkeit des Tests in ihrem Labor mit der Zeit aufrechterhalten wird.

VERFAHREN

13. Die Standardarbeitsanweisung (SOP) für den IL-8-Luc-Test ist verfügbar und sollte bei der Durchführung des Tests verwendet werden (18). Labore, die der Durchführung des Tests zugestimmt haben, können die rekombinante THP-G8-Zelllinie von GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nach Unterzeichnung einer Materialübertragungsvereinbarung (MTA) in Übereinstimmung mit den Bedingungen der OECD-Vorlage erhalten. Nachfolgend werden die Hauptkomponenten und Verfahren des Tests beschrieben.

Vorbereitung der Zellen

14. Die THP-G8-Zelllinie vom GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, sollte für die Durchführung des IL-8-Luc-Tests verwendet werden (siehe Abschnitte 8 und 13). Bei Erhalt werden die Zellen gewonnen (2 bis 4 Passagen) und als homogener Stamm eingefroren aufbewahrt. Zellen von diesem Stamm können bis zu einem Höchstwert von 12 Passagen oder maximal 6 Wochen gewonnen werden. Das für die Vermehrung verwendete Medium ist das RPMI-1640-Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), antibiotischer/antimyzotischer Lösung (100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B in 0,85 % Kochsalzlösung) (z. B. GIBCO Kat. Nr. 15240-062), 0,15 µg/ml Puromycin (z. B. CAS:58-58-2) und 300 µg/ml G418 (z. B. CAS:108321-42-2).
15. Vor ihrer Verwendung zu Testzwecken sollten die Zelle qualifiziert werden, indem ein Reaktivitätstest durchgeführt wird. Dieser Test sollte 1–2 Wochen oder 2–4 Passagen nach dem Auftauen mithilfe einer Positivkontrolle, 4-Nitrobenzylbromid (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % Reinheit) und der Negativkontrolle Milchsäure (LA) (CAS:50-21-5, ≥ 85 % Reinheit) durchgeführt werden. 4-NBB sollte eine positive Wirkung auf Ind-IL8LA (≥ 1,4) hervorrufen, während LA eine negative Wirkung auf Ind-IL8LA (< 1,4) hervorrufen sollte. Nur Zellen, die den Reaktivitätstest bestehen, werden für den Test verwendet. Der Test sollte gemäß den in den Abschnitten 22–24 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.
16. Zu Testzwecken werden THP-G8-Zellen bei einer Dichte von 2 bis 5×10^5 Zellen/ml ausgesät und 48 bis 96 Stunden in Kulturkolben vorgezüchtet. Am Tag des Tests werden die vom Kulturkolben geernteten Zellen mit RPMI-1640 mit 10 % FBS ohne Antibiotika gewaschen und anschließend mit RPMI-1640 mit 10 % FBS ohne Antibiotika bei 1×10^6 Zellen/ml resuspensiert. Die Zellen werden dann in einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden (z. B. Costar Kat. Nr. 3603) mit 50 µl (5×10^4 Zellen/well) verteilt.

Vorbereitung der Prüfchemikalie und Kontrollstoffe

17. Die Prüfchemikalie sowie die Kontrollstoffe werden am Tag des Tests vorbereitet. Bei dem IL-8-Luc-Test werden Prüfchemikalien in X-VIVO™ 15 gelöst, einem im Handel erhältlichen, serumfreien Medium (Lonza, 04-418Q), bis eine endgültige Konzentration von 20 mg/ml erreicht wurde. X-VIVO™ 15 wird in einem Mikrozentrifugenröhrlchen zu 20 mg/ml der Prüfchemikalie hinzugefügt (unabhängig von der Löslichkeit der Chemikalie) und auf ein Volumen von 1 ml gebracht und dann kräftig geschüttelt und auf einem Rotor bei einer Höchstgeschwindigkeit von 8 U/min 30 Minuten lang bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 20 °C geschüttelt. Wenn feste Chemikalien noch immer nicht löslich sind, wird das Röhrchen darüber hinaus im Ultraschallbad behandelt, bis

die Chemikalie sich komplett gelöst hat oder stabil verteilt wurde. Bei Prüfchemikalien, die in X-VIVO™ 15 löslich sind, wird die Lösung mit einem Faktor von 5 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und dann als X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie verwendet (4 mg/ml). Bei Prüfchemikalien, die nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind, wird das Gemisch erneut mindestens 30 Minuten lang rotiert und dann bei 15 000 U/min (\approx 20 000 g) 5 Minuten lang zentrifugiert; das sich daraus ergebende Tensid wird als X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie verwendet. Für den Einsatz anderer Lösungsmittel wie DMSO, Wasser oder Kulturmedium sollten ausreichende wissenschaftliche Gründe vorgelegt werden. Das detaillierte Verfahren zur Lösung von Chemikalien wird in Anlage 3.5 dargestellt. Die X-VIVO™ 15-Lösungen, die in den Abschnitten 18–23 beschrieben werden, werden 1:1 (v/v) mit den in der flachen Platte mit 96 Mulden vorbereiteten Zellsuspensionen gemischt (siehe Abschnitt 16).

18. Der erste Testdurchlauf zielt darauf ab, die zytotoxische Konzentration zu bestimmen und das Hautsensibilisierungspotenzial der Chemikalien zu untersuchen. Mithilfe von X-VIVO™ 15 werden serielle Verdünnungen der X-VIVO™ 15-Stammlösungen der Prüfchemikalien mit einem Verdünnungsfaktor von zwei (siehe Anlage 3.5) in einem Testblock mit 96 Mulden (z. B. Costar Kat. Nr. EW-01729-03) hergestellt. Dann werden 50 µl/Mulde verdünnte Lösung zu 50 µl der Zellsuspension in einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Damit reicht die endgültige Konzentration für Prüfchemikalien, die in X-VIVO™ 15 löslich sind, von 0,002 bis 2 mg/ml (Anlage 3.5). Bei Prüfchemikalien, die bei 20 mg/ml nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind, werden nur die Verdünnungsfaktoren bestimmt, die von 2 bis 2^{10} reichen, obwohl die tatsächlichen endgültigen Konzentrationen der Prüfchemikalien unbestimmt bleiben und von der gesättigten Konzentration der Prüfchemikalien in der X-VIVO™ 15-Stammlösung abhängen.
19. In nachfolgenden Testdurchläufen (d. h. das zweite, dritte und vierte Replikat) wird die X-VIVO™ 15-Stammlösung im ersten Versuch bei einer Konzentration hergestellt, die 4 Mal höher ist als die Konzentration der Zellviabilität 05 (CV05; die niedrigste Konzentration, bei der Inh-GAPLA < 0,05 wird). Wenn Inh-GAPLA bei der höchsten Konzentration im ersten Durchlauf nicht unter 0,05 fällt, wird die X-VIVO™ 15-Stammlösung bei der höchsten Konzentration im ersten Durchlauf hergestellt. Die Konzentration von CV05 wird berechnet, indem die Konzentration der Stammlösung im ersten Durchlauf durch den Verdünnungsfaktor für CV05 (X) (Verdünnungsfaktor CV05 (X) geteilt wird; der Verdünnungsfaktor, der erforderlich ist, um die Stammlösung auf CV05 zu verdünnen) (siehe Anlage 3.5). Bei Prüfstoffen, die bei 20 mg/ml nicht in X-VIVO löslich sind, wird

CV05 anhand der Konzentration der Stammlösung x 1/X bestimmt. Für die Durchläufe 2 bis 4 wird eine zweite Stammlösung wie 4 x CV50 vorbereitet (Anlage 3.5).

20. Serielle Verdünnungen der zweiten X-VIVO™ 15-Stammlösungen werden mit einem Verdünnungsfaktor von 1,5 mit einem Testblock mit 96 Mulden hergestellt. Dann werden 50 µl/Mulde verdünnte Lösung zu 50 µl der Zellsuspension in den Mulden einer flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Jede Konzentration jeder Prüfchemikalie sollte in 4 Mulden geprüft werden. Die Proben werden dann auf einem Platten-Schüttler gemischt und 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ gemischt und anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie unten beschrieben gemessen.
21. Die Lösungsmittelkontrolle ist das Gemisch von 50 µl/Mulde von X-VIVO™ 15 und 50 µl/Mulde der Zellsuspension in RPMI-1640 mit 10 % FBS.
22. Die empfohlene Positivkontrolle ist 4-NBB. 20 mg von 4-NBB werden in einem 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen vorbereitet, zu dem X-VIVO™ 15 bis auf 1 ml hinzugefügt wird. Das Röhrchen wird kräftig geschüttelt und auf einem Rotor bei einer Höchstgeschwindigkeit von 8 U/min mindestens 30 Minuten lang geschüttelt. Nach der Zentrifugierung bei 20 000 g für 5 Minuten wird das Tensid mit einem Faktor von 4 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und 500 µl des verdünnten Tensids werden in eine Mulde in einem Testblock mit 96 Mulden übertragen. Das verdünnte Tensid wird mit X-VIVO™ 15 mit Faktoren von 2 und 4 weiter verdünnt und 50 µl der Lösung wird zu 50 µl der THP-G8-Zellsuspension in den Mulden der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt (Anlage 3.6). Jede Konzentration der Positivkontrolle sollte in 4 Mulden geprüft werden. Die Platte wird auf einem Platten-Schüttler geschüttelt und in einem CO₂-Inkubator 16 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO₂), anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie in Abschnitt 29 beschrieben gemessen.
23. Die empfohlene Negativkontrolle ist LA. 20 mg von LA werden in einem 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen vorbereitet, zu dem X-VIVO™ 15 bis auf 1 ml hinzugefügt wird (20 mg/ml). 20 mg/ml der LA-Lösung werden um einen Faktor von 5 mit X-VIVO™ 15 verdünnt (4 mg/ml); 500 µl dieser 4 mg/ml-LA-Lösung werden in eine Mulde eines Testblocks mit 96 Mulden übertragen. Diese Lösung wird um einen Faktor von 2 mit X-VIVO™ 15 verdünnt und dann erneut um einen Faktor von 2 verdünnt, um 2 mg/ml- und 1 mg/ml-Lösungen herzustellen. 50 µl dieser 3 Lösungen und Vehikelkontrollen (X-VIVO™ 15) werden zu 50 µl der THP-G8-Zellsuspension in den Mulden der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden hinzugefügt. Jede Konzentration der Negativkontrolle wird in 4 Mulden geprüft. Die Platte wird auf einem Platten-Schüttler geschüttelt und in einem

CO₂-Inkubator 16 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO₂), anschließend wird die Luciferase-Aktivität wie in Abschnitt 29 beschrieben gemessen.

24. Andere geeignete Positiv- oder Negativkontrollen können verwendet werden, sofern historische Daten für die Ableitung vergleichbarer Akzeptanzkriterien für einen Testdurchlauf zur Verfügung stehen.
25. Es ist darauf zu achten, dass eine Verdunstung der flüchtigen Prüfchemikalien sowie eine Kreuzkontamination zwischen Mulden durch die Prüfchemikalien vermieden werden, indem die Platte beispielsweise vor der Inkubation mit den Prüfchemikalien versiegelt wird.
26. Bei den Prüfchemikalien und der Lösungsmittelkontrolle sind 2 bis 4 Durchläufe erforderlich, um eine positive oder negative Vorhersage ableiten zu können (siehe Tabelle 2). Jeder Durchlauf wird an einem anderen Tag mit einer frischen X-VIVO™ 15-Stammlösung der Prüfchemikalie und unabhängig voneinander gewonnenen Zellen vorgenommen. Die Zellen können aus derselben Passage stammen.

Messungen der Luciferase-Aktivität

27. Die Lumineszenz wird mithilfe eines Mikroplattenluminometers mit 96 Mulden gemessen, das mit optischen Filtern ausgestattet ist, z. B. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) und die ARVO-Serie (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Das Luminometer muss für jeden Test kalibriert werden, um Reproduzierbarkeit zu gewähren (19). Rekombinante orange und rot emittierende Luciferasen sind für diese Kalibrierung verfügbar.
28. 100 µl des vorgewärmten Tripluc® Luciferase-Test-Reagenz (Tripluc) wird in jede Mulde der Platte übertragen, die die mit oder ohne Chemikalien behandelte Zellsuspension enthält. Die Platte wird 10 Minuten lang bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 20 °C geschüttelt. Die Platte wird auf dem Luminometer platziert, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Die Biolumineszenz wird jeweils 3 Sekunden lang in der Abwesenheit (F0) und Anwesenheit (F1) des optischen Filters gemessen. Bei Verwendung anderer Einstellungen, z. B. je nach verwendetem Luminometermodell, sollten diese begründet werden.
29. Parameter für jede Konzentration werden aus den gemessenen Werten berechnet, z. B. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, die mittlere ±SD von IL8LA, die mittlere ±SD von GAPLA, die mittlere ±SD von nIL8LA, die mittlere ±SD von Ind-IL8LA, die mittlere ±SD von Inh-GAPLA und das 95 % Konfidenzintervall von Ind-IL8LA.

Definitionen der in diesem Abschnitt verwendeten Parameter werden in den Anlagen I bzw. IV bereitgestellt.

30. Vor der Messung wird die Farbunterscheidung in mehrfarbigen Reporter-Tests allgemein durch die Verwendung von Detektoren erzielt (Luminometer und Plattenleser), die mit optischen Filtern ausgestattet sind, wie beispielsweise Short-Cut-Filtern (Langpass oder Kurzpass) oder Bandpassfiltern. Die Übertragungskoeffizienten der Filter für jede Biolumineszenzsignalfarbe sollte vor dem Test gemäß Anlage 3.2 kalibriert werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenauswertung

31. Kriterien für eine positive/negative Entscheidung erfordern, dass in jedem Durchlauf:

- eine IL-8-Luc-Test-Vorhersage als positiv eingestuft wird, wenn eine Prüfchemikalie über einen Ind-IL8LA \geq von 1,4 verfügt und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls von Ind-IL8LA \geq 1,0 beträgt
- eine IL-8-Luc-Test-Vorhersage als negativ eingestuft wird, wenn eine Prüfchemikalie über einen Ind-IL8LA < 1,4 verfügt und/oder die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls von Ind-IL8LA < 1,0 beträgt

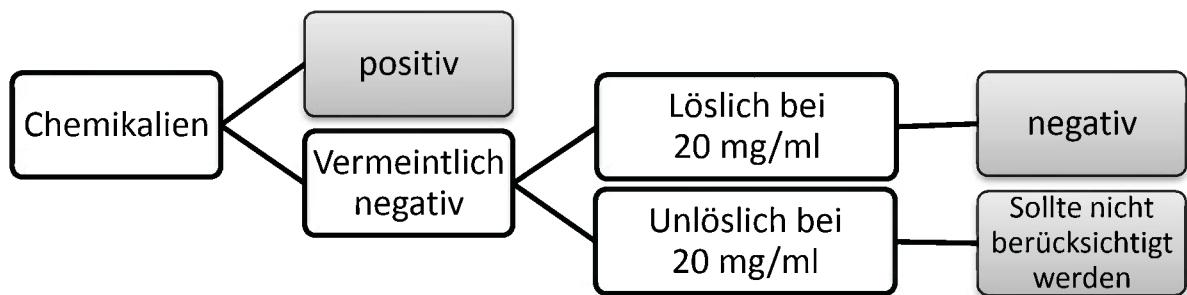
Vorhersagemodell

32. Prüfchemikalien, die zwei positive Ergebnisse in den 1., 2., 3. oder 4. Durchläufen liefern, werden als positiv identifiziert, während diejenigen, die drei negative Ergebnisse in den 1., 2., 3. oder 4. Durchläufen liefern, als vermeintlich negativ identifiziert werden (Tabelle 2). Unter den vermeintlich negativen Chemikalien werden Chemikalien, die bei 20 mg/ml von X-VIVOTM 15 gelöst werden, als negativ eingestuft, während Chemikalien, die nicht bei 20 mg/ml von X-VIVOTM 15 gelöst werden, nicht berücksichtigt werden sollten (Abbildung 1).

Tabelle 2: Kriterien zur Identifizierung von positiv und vermeintlich negativ

1. Durchlauf	2. Durchlauf	3. Durchlauf	4. Durchlauf	Endgültige Vorhersage
------------------------	--------------	--------------	--------------	---------------------------------

positiv	positiv	-	-	positiv
	negativ	positiv	-	positiv
negativ	negativ	positiv	positiv	
		negativ	Vermeintlich negativ	
negativ	positiv	positiv	-	positiv
	negativ	positiv	positiv	
		negativ	Vermeintlich negativ	
negativ	positiv	positiv	positiv	
		negativ	Vermeintlich negativ	
	negativ	-	Vermeintlich negativ	

Abb. 1: Vorhersagemodell für endgültiges Urteil

Akzeptanzkriterien

33. Bei der Verwendung des IL-8-Luc-Tests sollten die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt werden:

- Ind-IL8LA sollte in mindestens einer Konzentration der Positivkontrolle, 4-NBB, in jedem Durchlauf mehr als 5,0 betragen.

- Ind-IL8LA sollte in jeder Konzentration der Negativkontrolle, Milchsäure, in jedem Durchlauf weniger als 1,4 betragen.
- Daten aus Platten, für die die GAPLA der Kontrollmulden mit Zellen und Tripluc aber ohne Chemikalien weniger als 5 Mal des Wertes der Mulde, die nur das Prüfmedium enthält (50 µl/Mulde von RPMI-1640 mit 10 % FBS und 50 µl/Mulde von X-VIVOTM 15), beträgt, sollten abgelehnt werden.
- Daten aus Platten, für die die Inh-GAPLA aller Konzentrationen des Tests oder Kontrollchemikalien weniger als 0,05 beträgt, sollten abgelehnt werden. In diesem Fall sollte der erste Test wiederholt werden, damit die höchste endgültige Konzentration des wiederholten Tests die niedrigste endgültige Konzentration des vorherigen Tests ist.

Prüfbericht

34. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien

Einkomponentiger Stoff:

- 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 dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Löslichkeit in X-VIVOTM 15. Bei Chemikalien, die in X-VIVOTM 15 nicht löslich sind, ob ein Niederschlag oder ein Aufschwemmen nach der Zentrifugierung beobachtet wird;
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;

- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie, wenn X-VIVOTM 15 nicht verwendet wurde.

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, 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 dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- Löslichkeit in X-VIVOTM 15. Bei Chemikalien, die in X-VIVOTM 15 nicht löslich sind, ob ein Niederschlag oder ein Aufschwemmen nach der Zentrifugierung beobachtet wird;
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels für jede Prüfchemikalie, wenn X-VIVOTM 15 nicht verwendet wurde.

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, 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 dem Test, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);
- geprüfte Konzentration(en);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar;
- ggf. Verweis auf historische Ergebnisse von Positivkontrollen, die geeignete Akzeptanzkriterien dokumentieren.

Negativkontrolle:

- 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 der Prüfrichtlinie genannten Negativkontrollen 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 des verwendeten Prüfprotokolls;
- verwendete Zelllinie, zugehörige Lagerbedingungen und Quelle (z. B. Einrichtung, von der sie gewonnen wurde);
- Chargennummer und Herkunft von FBC, Lieferantenname, Chargennummer der flachen schwarzen Platte mit 96 Mulden und Chargennummer des Tripluc-Reagens;

- Passagenanzahl und Zelldichte für den Test;
- angewandte Zellzählungsmethode bei der Beimpfung vor dem Test und ergriffene Maßnahmen zur Gewährleistung einer homogenen quantitativen Verteilung der Zellen;
- verwendetes Luminometer (z. B. Modell), einschließlich Geräteeinstellungen, verwendetes Luciferase-Substrat und Nachweis geeigneter Lumineszenzmessungen basierend auf der in Anlage 3.2 beschriebenen Kontrollprüfung;
- angewandtes Verfahren zum Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung des Tests (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung des Tests im Zeitverlauf.

Prüfverfahren

- Anzahl an Replikaten und ausgeführten Durchläufen;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie, Applikationsverfahren und Expositionsdauer (falls von den Empfehlungen abweichend);
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Beschreibung der angewandten Studienakzeptanzkriterien;
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren.

Ergebnisse

- Messungen von IL8LA und GAPLA;
- Berechnungen für nIL8LA, Ind-IL8LA und Inh-GAPLA;
- das 95 %ige Konfidenzintervall von Ind-IL8LA;
- 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 anhand des IL-8-Luc-Tests erhaltenen Ergebnisse;
- Erörterung der Test-Ergebnisse im Rahmen eines IATA, sofern andere sachdienliche Informationen verfügbar sind.

Schlussfolgerung

LITERATURHINWEISE

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359–69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371–9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816–30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S,

- Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337–51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275–84.
 - (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147–155.
 - (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646–57.
 - (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
 - (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286–91.
 - (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271–9.
 - (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891–4.
 - (15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, Frankreich
 - (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International

Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, Frankreich.

- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Final%20Draft%20GIVIMP.pdf).
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Verfügbar unter. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046–9.
- (20) 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, Frankreich.
- (21) Vereinte Nationen (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sechste überarbeitete Fassung. New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Verfügbar unter: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/rev05/05files_e.html.

Anlage 3.1

DEFINITIONEN

Genauigkeit: Grad der Übereinstimmung zwischen Prüfergebnissen 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 eines Tests (16).

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 (20).

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

CV05: Zellviabilität 05, d. h. die Mindestkonzentration, bei der die Chemikalien weniger als 0,05 von Inh-GAPLA aufweisen.

FInSLO-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf Ind-IL8LA zu beziehen. Siehe Ind-IL8LA für eine Definition.

GAPLA: Luciferase-Aktivität der „Stable Luciferase Red (SLR)“ ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$), reguliert durch den GAPDH-Träger und zeigt die Zellviabilität und die Anzahl der lebensfähigen Zellen auf.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder einer Situation, potenziell schädigende Auswirkungen zu haben, wenn ein Organismus, ein System oder eine (Teil-)Population diesem Stoff ausgesetzt ist.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Ein strukturierter Ansatz zur Gefahrenidentifizierung (Potenzial), Gefahrencharakterisierung (Potenz) und/oder Sicherheitsbeurteilung (Potenzial/Potenz und Exposition) einer Chemikalie oder Gruppe von Chemikalien, der strategisch sämtliche relevanten Daten für eine informierte regulatorische Entscheidung hinsichtlich potenziellen Gefahren und/oder Risiken und/oder

des Bedürfnisses weiterer gezielter und somit minimaler Tests integriert und abwägt.

II-SLR-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf Inh-GAPLA zu beziehen. Siehe Inh-GAPLA für eine Definition

IL-8 (Interleukin-8): Ein aus Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Makrophagen und Monozyten abgeleitetes Zytokin, das Chemotaxis von Neutrophilen und T-Zell-Lymphozyten verursacht.

IL8LA: Luciferase-Aktivität von „Stable Luciferase Orange (SLO)“ ($\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$), reguliert durch IL-8-Träger.

Ind-IL8LA: n-fache Induktion von IL8LA. Der Wert wird erhalten, indem der nIL8LA der THP-G8-Zellen, die mit Chemikalien behandelt wurden, durch den der nicht stimulierten THP-G8-Zellen geteilt wird und die Induktion der IL-8-Trägeraktivität durch Chemikalien darstellt.

Inh-GAPLA: Hemmung von GAPLA. Der Wert wird erhalten, indem GAPLA des mit Chemikalien behandelten THP-G8 durch GAPLA des nicht behandelten THP-G8 geteilt wird und die Zytotoxizität der Chemikalien darstellt.

Minimaler Induktionsschwellenwert (MIT): die niedrigste Konzentration, bei der eine Chemikalie die positiven Kriterien erfüllt

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehreren Stoffen besteht.

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

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von $\geq 10 \text{ % w/w}$ und $< 80 \text{ % w/w}$ 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.

nIL8LA: Die SLO-Luciferase-Aktivität, die die IL-8-Trägeraktivität (IL8LA) widerspiegelt, die durch die SLR-Luciferase-Aktivität normalisiert wird, die die GAPDH-Trägeraktivität (GALPA) widerspiegelt. Der Wert stellt die IL-8-Trägeraktivität nach Berücksichtigung der Zellviabilität oder der Zellanzahl dar.

nSLO-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf nIL8LA zu beziehen. Siehe nIL8LA für eine Definition

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Komponenten eines Prüfsystems 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.

Prähaptene: Chemikalien, die durch abiotische Transformation zu Allergenen werden.

Prohaptene: Chemikalien, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, um ihr Hautsensibilisierungspotenzial auszuschöpfen.

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 umfasst die Einbeziehung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Tests (16).

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 (16).

Durchlauf: Ein Durchlauf besteht aus einer oder mehreren hintereinander getesteten Prüfchemikalien mit einer Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle und mit einer Positivkontrolle.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkungsvollen Chemikalien, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit

kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (16).

SLO-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf IL8LA zu beziehen. Siehe IL8LA für eine Definition.

SLR-LA: Abkürzung, die im Validierungsbericht und in vorherigen Veröffentlichungen bezüglich des IL-8-Luc-Tests verwendet wurde, um sich auf GAPLA zu beziehen. Siehe GAPLA für eine Definition.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die sämtliche Komponenten eines Prüfsystems enthält, außer der Prüfchemikalie, aber einschließlich des verwendeten Lösungsmittels/Vehikels. Sie wird verwendet, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst oder stabil verteilt wurden, zu bestimmen. Wenn mit einer simultanen Medienkontrolle geprüft wird, zeigt diese Probe außerdem, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfmethode korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Tests mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (16).

Stoff: Chemische Elemente und ihre Verbindungen in natürlicher Form oder durch ein Produktionsverfahren hergestellt, einschließlich der zur Wahrung der Produktstabilität erforderlichen 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.

Tensid: Dies eine Substanz, auch oberflächenaktives Mittel genannt, wie z. B. ein Waschmittel, die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit reduzieren und ihr somit ermöglichen kann, zu schäumen oder Feststoffe zu durchdringen; ein Tensid wird auch als Netzmittel bezeichnet. (TG437)

Prüfchemikalie: Stoffe oder Gemische, die mit dieser Methode geprüft wurden.

THP-G8: Eine IL-8-Reporter-Zelllinie, die im IL-8-Luc-Test verwendet wird. Die humane makrophagenähnliche Zelllinie THP-1 wurde unter der Kontrolle der IL-8- bzw. GAPDH-

Träger mit den SLO- und SLR-Luciferasegenen transfiziert.

Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN-GHS): Ein System, das die Einstufung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß normierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und Umweltgefahren vorschlägt und entsprechende Kommunikationselemente wie Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenberichte, Berichte zu Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitsdatenblätter anspricht, damit Informationen zu Nebenwirkungen mit Blick auf den Schutz von Menschen (einschließlich Mitarbeitern, Arbeitern, Logistikern, Verbrauchern und Ersthelfern) und der Umwelt zu übermitteln (21).

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

Gültige Prüfmethode: Ein Test, von der angenommen wird, dass sie über ein ausreichendes Maß an Relevanz und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck verfügt und die auf wissenschaftlich bewährten Prinzipien basieren. Ein Test ist niemals in einem absoluten Sinn gültig, sondern im Verhältnis zu einem definierten Zweck.

Anlage 3.2

GRUNDSATZ DER MESSUNG DER LUCIFERASE-AKTIVITÄT UND BESTIMMUNG DER ÜBERTRAGUNGSKOEFFIZIENTEN DES OPTISCHEN FILTERS FÜR SLO UND SLR

Das MultiReporter-Prüfsystem -Tripluc- kann mit einem Luminometer des Typs Mikroplatte mit einem mehrfarbigen Erkennungssystem verwendet werden, das einen optischen Filter ausstatten kann (z. B. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Der bei Messungen verwendete optische Filter ist ein 600–620 nm Lang- oder Kurzpassfilter oder ein 600–700 nm Bandpassfilter.

Messung der zweifarbigen Luciferasen mit einem optischen Filter.

Dies ist ein Beispiel, das Phelios AB-2350 (ATTO) verwendet. Dieses Luminometer ist mit einem 600 nm Langpassfilter (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, Filter 1) zum Splitten der SLO- ($\lambda_{\max} = 580$ nm) und SLR-Lumineszenz ($\lambda_{\max} = 630$ nm) ausgestattet.

Um die Übertragungskoeffizienten des 600 nm LP zu bestimmen muss zuerst mit aufbereiteten SLO- und SLR-Luciferase-Enzymen i) die Intensität der SLO- und SLR-Biolumineszenzintensität ohne Filter (F_0), ii) die SLO- und SLR-Biolumineszenzintensität, die durch den 600 nm LP (Filter 1) passiert ist, gemessen werden und iii) die Übertragungskoeffizienten des 600 nm LP für die unten aufgeführten SLO und SLR berechnet werden.

Übertragungskoeffizienten		Abkürzung	Definition
SLO	Filter 1 Übertragungskoeffizient	kO_{R60}	Übertragungskoeffizient des Filters für die SLO
SLR	Filter 1 Übertragungskoeffizient	kR_{R60}	Übertragungskoeffizient des Filters für die SLR

Wenn die Intensität von SLO und SLR in Prüfproben als O bzw. R definiert ist, werden i) die Intensität des Lichts ohne Filter (alle optisch) F_0 und ii) die Intensität des Lichts, das durch den 600 nm LP (Filter 1) F_1 geschickt wird, wie unten beschrieben.

$$F_0 = O + R$$

$$F_1 = kO_{R60} \times O + kR_{R60} \times R$$

Diese Formeln können wie folgt umformuliert werden:

$$\begin{pmatrix} F_0 \\ F_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Dann können anhand der berechneten Transmissionsfaktoren (κO_{R60} und κR_{R60}) der gemessenen F0 and F1 die O- und R-Werte wie folgt berechnet werden:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F_0 \\ F_1 \end{pmatrix}$$

Materialien und Methoden zur Bestimmung des Transmissionsfaktors

(1) Reagenzien

Einzelne aufbereitete Luciferase-Enzyme:

Lyophilisiertes aufbereitetes SLO-Enzym

Lyophilisiertes aufbereitetes SLR-Enzym

(die für die Validierungsarbeiten von GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan mit THP-G8-Zelllinie erhalten wurden)

Test-Reagenz:

Tripluc® Luciferase-Test-Reagenz (zum Beispiel aus TOYOB0 Kat. Nr. MRA-301)

Medium: für Luciferase-Test (30 ml, gelagert bei 2–8°C)

Reagenz	Konz.	Finale Konz. in Medium	Erforder- liche Menge
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Herstellung der Enzymlösung

Das lyophilisierte, aufbereitete Luciferase-Enzym im Röhrchen lösen, indem 200 µl

10 ~ 100 mM Tris/HCl oder Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) mit 10 % (w/v) Glycerol hinzugefügt werden, die Enzymlösung in 10 µl Aliquoten in Einwegröhren mit einem Volumen von 1,5 ml aufgeteilt wird und diese bei -80 °C in einem Gefrierschrank gelagert werden. Die gefrorene Enzymlösung kann bis zu 6 Monate verwendet werden. Wenn es verwendet wird, dann 1 ml des Mediums für den Luciferase-Test (RPMI-1640 mit 10 % FBS) zu jedem Röhrchen mit den Enzymlösungen (verdünnte Enzymlösung) hinzufügen und diese auf Eis halten, um eine Deaktivierung zu verhindern.

(3) Messung der Biolumineszenz

Tripluc®-Luciferase-Test-Reagenz (Tripluc) auftauen und bei Raumtemperatur entweder in einem Wasserbad oder bei Umgebungslufttemperatur aufbewahren. Das Luminometer 30 Minuten vor Beginn der Messungen einschalten, damit sich der Fotovervielfacher stabilisieren kann. 100 µl der verdünnten Enzymlösung in eine schwarze Platte mit 96 Mulden übertragen (flache Unterseite) (die SLO-Referenzprobe zu #B1, #B2, #B3, die SLR-Referenzprobe zu #D1, #D2, #D3). Anschließend 100 µl vorgewärmtes Tripluc mithilfe eines Pipetman in jede Mulde der Platte geben, die die verdünnte Enzymlösung enthält. Die Platte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) mit einem Platten-Schüttler schütteln. Die Luftblasen aus den Lösungen in den Mulden entfernen, wenn diese erscheinen. Die Platte im Luminometer platzieren, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Die Biolumineszenz wird jeweils 3 Sekunden lang in der Abwesenheit (F0) und Anwesenheit (F1) des optischen Filters gemessen.

Der Übertragungskoeffizient des optischen Filters wurde wie folgt berechnet:

Übertragungskoeffizient (SLO (κO_{R60})) = (Anz. B1 von F1 + Anz. B2 von F1 + Anz. B3 von F1) / (Anz. B1 von F0 + Anz. B2 von F0 + Anz. B3 von F0)

Übertragungskoeffizient (SLR (κR_{R60})) = (Anz. D1 von F1 + Anz. D2 von F1 + Anz. D3 von F1) / (Anz. D1 von F0 + Anz. D2 von F0 + Anz. D3 von F0)

Die berechneten Transmissionsfaktoren werden für alle Messungen verwendet, die mit demselben Luminometer durchgeführt werden.

Qualitätskontrolle der Ausrüstung

Es sollten die im IL-8-Luc-Protokoll beschriebenen Verfahren verwendet werden (18).

Anlage 3.3**LEISTUNGSSTOFFE**

Vor der routinemäßigen Anwendung des in dieser Anlage zu Prüfmethode B.71 beschriebenen Tests sollten Labors ihre technische Leistungsfähigkeit demonstrieren, indem sie die erwartete IL-8-Luc-Vorhersage für die in Tabelle 1 empfohlenen 10 Stoffe ermitteln und die Werte, die in den betreffenden Referenzbereich fallen, bei mindestens 8 der 10 Leistungsstoffe bestimmen (ausgewählt, um den Reaktionsbereich für Hautsensibilisierungsgefahren zu repräsentieren). Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, und dass qualitativ hochwertige In-vivo-Referenzdaten sowie qualitativ hochwertige In-vitro-Daten aus dem IL-8-Luc-Test verfügbar sind. Außerdem sind veröffentlichte Referenzdaten für den IL-8-Luc-Test verfügbar (6) (1).

Tabelle 1: Empfohlene Stoffe zum Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit beim IL-8-Luc-Test

Leistungsstoffe	CAS Nr.	Zustand	Löslichkeit in X-VIVO15 bei 20 mg/ml	In-vivo-Vorhersage ¹	IL-8 Luc-Vorhersage ²		Referenzbereich (µg/ml) ³	
					CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵	(µg/ml) ³	
2,4-Dinitrochlorbenzol	97-00-7	fest	unlöslich	Sensibilisator (extrem)	positiv	2,3–3,9	0,5–2,3	
Formaldehyd	50-00-0	flüssig	löslich	Sensibilisator (stark)	positiv	9–30	4–9	
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	fest	unlöslich	Sensibilisator (mäßig)	positiv	250–290	60–250	
Ethylendiamin	107-15-3	flüssig	löslich	Sensibilisator (mäßig)	positiv	500–700	0,1–0,4	
Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	flüssig	unlöslich	Sensibilisator (schwach)	positiv	> 2000	0,04–0,1	
4-Allylanisol (Estragol)	140-67-0	flüssig	unlöslich	Sensibilisator (schwach)	positiv	> 2000	0,01–0,07	
Streptomycinsulfat	3810-74-0	fest	löslich	Nichtsensibilisator	negativ	> 2000	> 2000	
Glyzerin	56-81-5	flüssig	löslich	Nichtsensibilisator	negativ	> 2000	> 2000	
Isopropanol	67-63-0	flüssig	löslich	Nichtsensibilisator	negativ	> 2000	> 2000	

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

¹ Die In-vivo-Potenz wird unter Anwendung der von ECETOC vorgeschlagenen Kriterien abgeleitet (19).

² Basierend auf den historischen beobachteten Werten (1) (6).

³ CV05 und IL-8 Luc MIT wurden mithilfe der durch EPI SuiteTM gegebenen Wasserlöslichkeit berechnet.

⁴ CV05: die Mindestkonzentration, bei der die Chemikalien weniger als 0,05 von Inh-GAPLA aufweisen.

⁵ MIT: die niedrigsten Konzentrationen, bei denen eine Chemikalie die positiven Kriterien erfüllt.

Anlage 3.4

INDIZES UND URTEILSKRITERIEN

nIL8LA (nSLO-LA)

Die j. Wiederholung ($j = 1-4$) der i. Konzentration ($i = 0-11$) wird für IL8LA (SLO-LA) bzw. GAPLA (SLR-LA) gemessen. Die normalisierte IL8LA wird bezeichnet als nIL8LA (nSLO-LA) und definiert als:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Dies ist die Grundmaßeinheit in diesem Test.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Die vielfache Steigerung der gemittelten nIL8LA (nSLO-LA) für die Wiederholung auf der i. Konzentration im Vergleich zu ihr bei der 0-Konzentration, Ind-IL8LA, ist die primäre Messung dieser Tests. Das Verhältnis wird durch die folgende Formel bestimmt:

$$\text{Ind - IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Das Hauptlabor hat vorgeschlagen, dass ein Wert von 1,4 einem positiven Ergebnis für die geprüfte Chemikalie entspricht. Dieser Wert basiert auf der Untersuchung der historischen Daten des Hauptlabors. Das Datenmanagement-Team nutzte diesen Wert dann in allen Phasen der Validierungsstudie. Das primäre Ergebnis, Ind-IL8LA, ist das Verhältnis von 2 arithmetischen Mitteln, wie sie in der Gleichung dargestellt werden.

95 % Konfidenzintervall (95 % CI)

Das auf dem Verhältnis basierende 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) kann so eingeschätzt werden, dass es die Präzision dieser primären Ergebnismessung zeigt. Die

untere Grenze des 95 % CI ≥ 1 zeigt an, dass die nIL8LA mit der i. Konzentration deutlich größer ist als die mit Lösungsmittelkontrolle. Es gibt verschiedene Arten, auf die das 95 % CI erstellt wird. Wir nutzten die Methode, die in dieser Studie als Fiellers Theorem bekannt ist. Das Theorem des 95 % Konfidenzintervalls wird aus der folgenden Formel erhalten:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

Dabei gilt:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ und } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ ist das 97,5te Perzentil der zentralen t-Verteilung mit dem v des Freiheitsgrades, wobei

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Die Inh-GAPLA ist ein Verhältnis der gemittelten GAPLA (SLR-LA) für die Wiederholung der i. Konzentration im Vergleich zu der mit Lösungsmittelkontrolle und dies wird folgendermaßen bestimmt:

$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

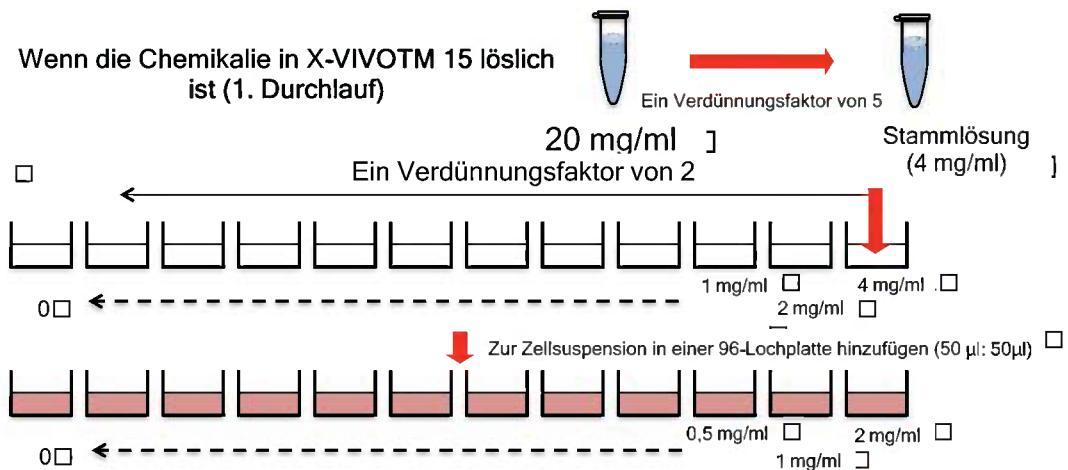
Da die GAPLA der Nenner der nIL8LA ist, verursacht ein extrem kleiner Wert eine große Schwankung der nIL8LA. Deshalb können Ind-IL8LA-Werte mit einem extrem kleinen

Wert von Inh-GAPLA (weniger als 0,05) als eine schlechte Präzision angesehen werden.

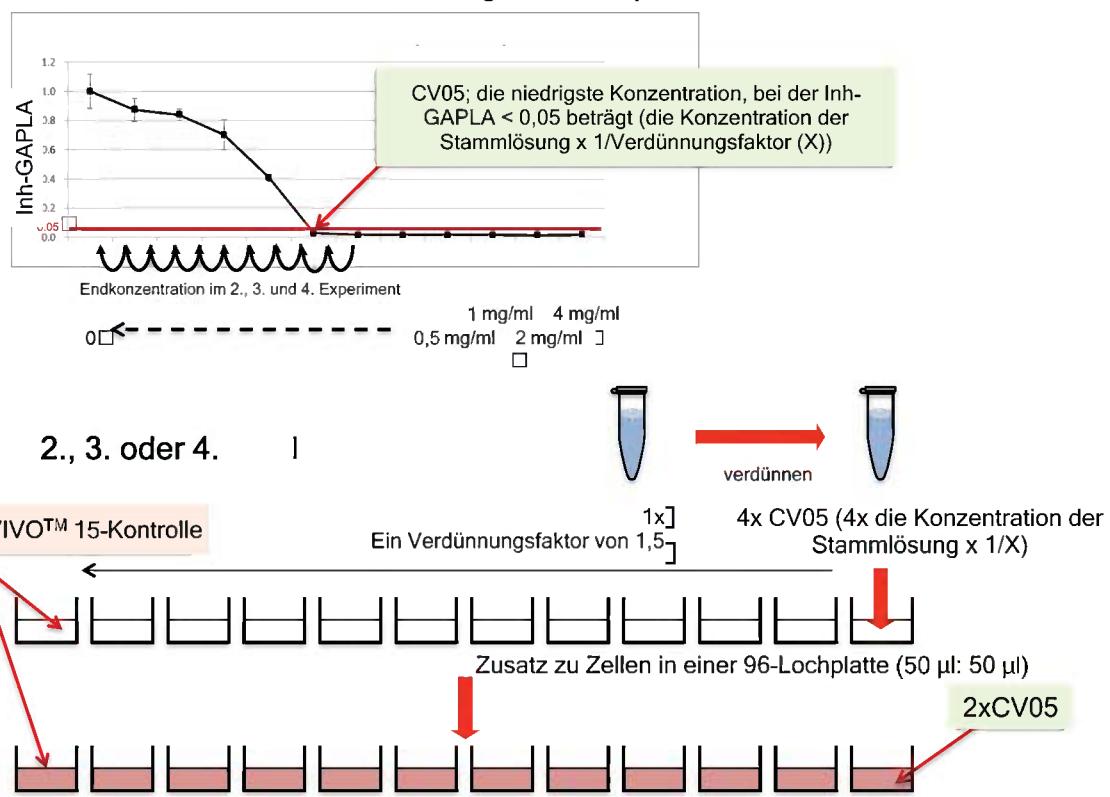
Anlage 3.5

DAS SCHEMA DER METHODEN ZUM LÖSEN VON CHEMIKALIEN FÜR DEN IL-8-LUC-TEST.

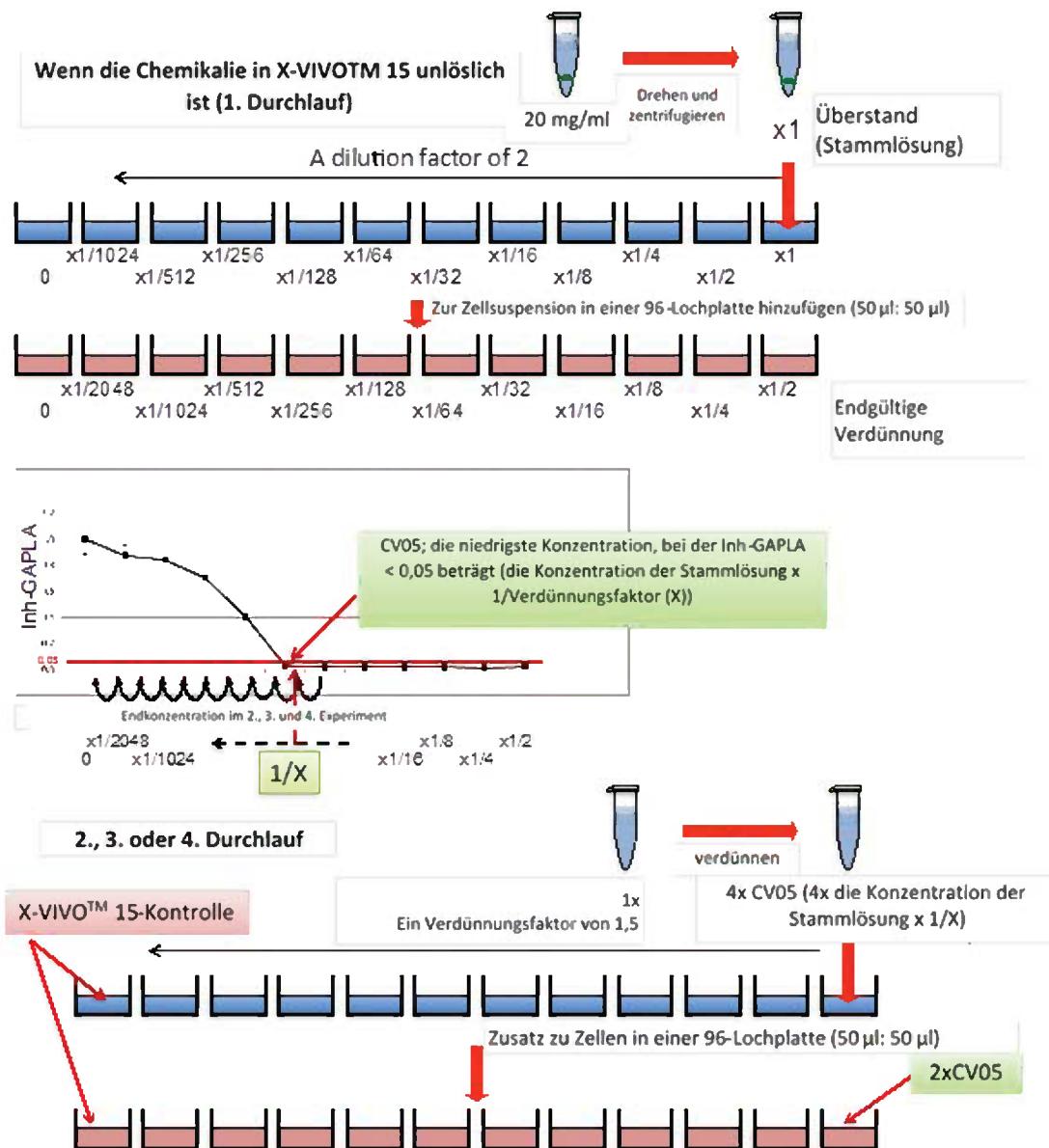
(a) Bei Chemikalien, die bei 20 mg/ml in X-VIVOTM 15 gelöst sind



Die höchste Konzentration der folgenden Experimente bestimmen



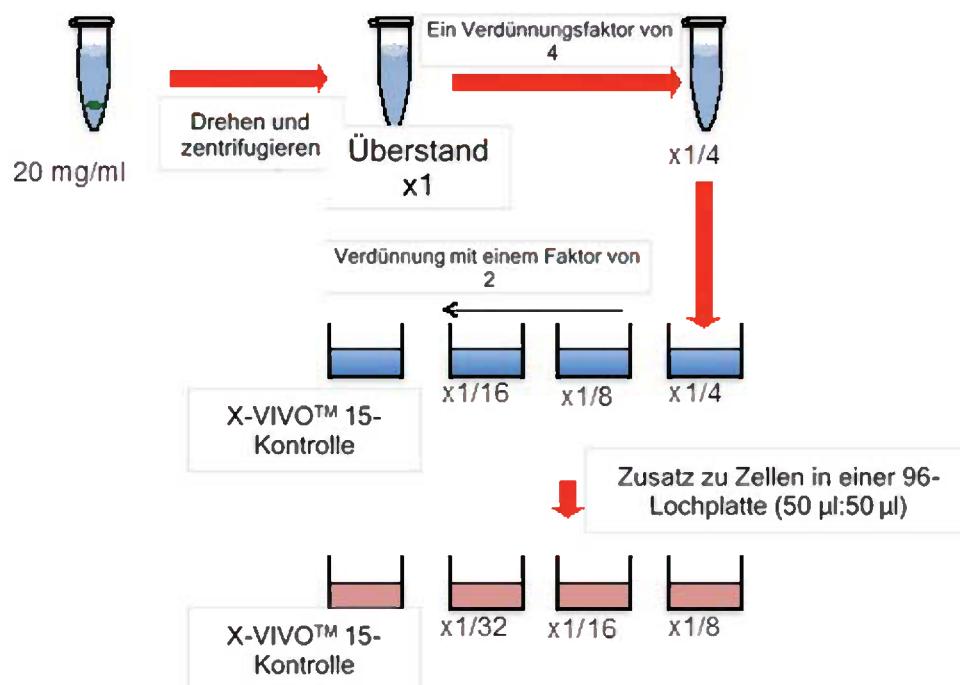
(b) Bei Chemikalien, die bei 20 mg/ml in X-VIVOTM 15 unlöslich sind



Anlage 3.6

DAS SCHEMA DER METHODE ZUM LÖSEN VON 4-NBB FÜR DIE POSITIVKONTROLLE DES IL-8-LUC-TESTS.

Die Positivkontrolle: 4-NBB (unlöslich in X-VIVO™ 15)



"

(9) In Teil C werden die folgenden Kapitel angefügt:

„C.52 MEDAKA ERWEITERTE 1-GENERATIONEN-REPRODUKTIONSTEST (MEOGRT)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 240 (2015). Der Medaka Extended One Generation Test (MEOGRT) beschreibt eine umfassende Prüfmethode auf der Grundlage von Fischen, die über mehrere Generationen hinweg exponiert werden, um Daten für die ökologische Gefahren- und Risikobeurteilung von Chemikalien zu liefern, einschließlich von Chemikalien mit mutmaßlicher endokriner Wirkung (EDCs). Die Exposition während des MEOGRT wird bis zum Schlüpfen (bis zwei Wochen nach der Befruchtung, wpf) in der zweiten (F2) Generation fortgesetzt. Zusätzliche Untersuchungen wären erforderlich, um die Erweiterung der F2-Generation über das Schlüpfen hinaus zu rechtfertigen; zu diesem Zeitpunkt gibt es nicht genügend Informationen, um relevante Bedingungen oder Kriterien für die Berechtigung der Erweiterung der F2-Generation zu gewährleisten. Diese Prüfmethode kann jedoch regelmäßig aktualisiert werden, um neue Informationen und Daten zu berücksichtigen. Beispielsweise könnten Leitlinien zur Erweiterung der F2-Generation durch Reproduktion unter bestimmten Umständen potenziell hilfreich sein (z. B. Chemikalien mit einem hohen Biokonzentrationspotenzial oder Anzeichen von generationsübergreifenden Auswirkungen in anderen Taxa). Diese Prüfmethode kann verwendet werden, um die potenziellen chronischen Effekte von Chemikalien bei Fischen zu beurteilen, einschließlich von Chemikalien mit potenziell endokriner Wirkung. Diese Methode legt ihren primären Schwerpunkt auf die potenziell populationsrelevanten Effekte (nämlich negative Auswirkungen auf das Überleben, die Entwicklung, das Wachstum und die Reproduktion) für die Berechnung einer No Observed Effect Concentration (NOEC) oder einer Effect Concentration (ECx), obwohl angemerkt werden sollte, dass ECx-Ansätze sich selten für große Studien dieser Art eignen, bei denen die Steigerung der Prüfkonzentrationen zur Bestimmung der gewünschten ECx unpraktisch sein kann, was aufgrund der hohen Anzahl an untersuchten Tieren auch zu beträchtlichen Bedenken hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere führen kann. Bei Chemikalien, die keine Beurteilung über mehrere Generationen hinweg erfordern oder Chemikalien, die keine Chemikalien mit potenziell endokriner Wirkung sind, eignen sich andere Prüfmethoden

eventuell eher (1). Der japanische Reiskäpfpling ist aufgrund seines kurzen Lebenszyklus und der Möglichkeit, sein genetisches Geschlecht (2) zu bestimmen, was als kritische Komponente für diese Prüfmethode angesehen wird, die geeignete Spezies für diese Prüfmethode. Die spezifischen Methoden und Beobachtungsendpunkte, die in dieser Methode aufgeführt werden, gelten nur für den japanischen Reiskäpfling. Andere kleine Fischarten (z. B. Zebrafisch) können an ein ähnliches Prüfprotokoll angepasst werden.

2. Diese Prüfmethode misst verschiedene biologische Endpunkte. Der primäre Schwerpunkt liegt auf den potenziellen negativen Auswirkungen auf die populationsrelevanten Parameter, einschließlich Überleben, grobe Entwicklung, Wachstum und Reproduktion. Um mechanistische Informationen und eine Verbindung zwischen Ergebnissen anderer Arten von Feld- und Laborstudien bereitzustellen, bei denen es a posteriori Nachweise dafür gibt, dass eine Chemikalie potenziell die Aktivität eines endokrinen Disruptors aufweist (z. B. androgene oder östrogene Aktivitäten bei anderen Prüfungen und Tests), dann werden zweitrangig andere nützliche Informationen gewonnen, indem *Vitellogenin* (*vtg*) mRNA (oder Vitellogeninprotein, VTG), phänotypische sekundäre Geschlechtsmerkmale (SSC) in Bezug auf das genetische Geschlecht gemessen werden und die Histopathologie bewertet wird. Es sollte angemerkt werden, dass wenn von einer Prüfchemikalie oder ihren Stoffwechselprodukten nicht angenommen wird, dass sie EDCs sind, es eventuelle nicht erforderlich ist, diese sekundären Endpunkte zu messen und weniger ressourcen- und tierintensive Studien angemessener sein könnten (1). Die in dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

3. Aufgrund der begrenzten Anzahl an geprüften Chemikalien und Laboren, die an der Validierung dieses eher komplexen Tests beteiligt sind, wird erwartet, dass die Prüfmethode überarbeitet und wenn erforderlich im Hinblick auf die gewonnene Erfahrung aktualisiert wird, wenn eine ausreichende Anzahl an Studien verfügbar ist, um den Einfluss dieses neuen Studiendesigns zu ermitteln. Die Daten können auf Stufe 5 des OECD-Rahmenkonzepts zur Prüfung und Bewertung der endokrinen Disruptoren verwendet werden (3). Die Prüfmethode beginnt damit, den adulten Fisch (die F0-Generation) in der Reproduktionsphase der Prüfchemikalie auszusetzen. Die Exposition wird über die Entwicklung und Reproduktion in der F1- und über das Schlüpfen in der F2-Generation fortgesetzt; daher ermöglicht der Test die Bewertung der strukturellen und aktivierenden endokrinen Pfade. Ein Konzept der Beweiskraft der Daten kann angewandt werden, wenn die auf Endokrine bezogenen Endpunkte interpretiert werden.

4. Der Test sollte eine ausreichende Anzahl an Individuen umfassen, um ausreichend Leistung für die Beurteilung der reproduktionsrelevanten Endpunkte (siehe Anlage 3) zu gewährleisten, während sichergestellt wird, dass die Anzahl der verwendeten Tiere aus Gründen des Wohlbefindens der Tiere minimal ist. Mit Blick auf die hohe Zahl der verwendeten Versuchstiere ist es wichtig, das Bedürfnis für den Test in Verbindung mit bestehenden Daten, die bereits relevante Informationen zu vielen der Endpunkte des MEOGRT enthalten könnten, sorgfältig abzuwägen. Hilfestellung zu dieser Angelegenheit kann dem OECD-Rahmen zur Toxizitätsprüfung an Fischen (1) entnommen werden.
5. Die Prüfmethode wurde primär entwickelt, um die Wirkungen eines einzelnen Stoffes zu unterscheiden. Wenn jedoch ein Test eines Gemischs erforderlich ist, sollte geprüft werden, ob sie für solche Zwecke geeignete Ergebnisse liefert.
6. Vor Beginn des Tests ist es wichtig, Informationen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie zu haben, insbesondere, um die Herstellung stabiler chemischer Lösungen zu gewährleisten. Es ist zudem erforderlich, eine ausreichend sensitive Methode zur Verifizierung der Konzentrationen der Prüfchemikalie zu besitzen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Der Test beginnt, indem geschlechtsreife männliche und weibliche Fische (mindestens 12 wpf) 3 Wochen lang in Brutpaaren gehalten werden. In dieser Zeit wird die Prüfchemikalie je nach ihrem toxikokinetischen Verhalten im Organismus der Elterngeneration (F0) verteilt. Die Eier werden so nahe wie möglich um den ersten Tag der vierten Woche herum gesammelt, um die F1-Generation zu starten. Während der Aufzucht der F1-Generation (insgesamt 15 Wochen) werden die Schlupffähigkeit und das Überleben bewertet. Zusätzlich dazu werden für Entwicklungsendpunkte Stichproben der Fische bei 9-10 wpf entnommen und das Laichen drei Wochen lang von 12 bis 14 wpf beurteilt. Eine F2-Generation wird nach der dritten Woche der Reproduktionsbewertung gestartet und aufgezogen, bis die Schlüpfphase abgeschlossen ist.

TESTVALIDITÄTSKRITERIEN

8. Es gelten die folgenden Kriterien für die Testvalidität:

- Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs sollte während der gesamten Prüfdauer > 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;

- Die mittlere Wassertemperatur über die gesamte Dauer der Studie hinweg sollte zwischen 24 und 26 °C liegen. Kurze Abweichungen vom Mittelwert der einzelnen Aquarien sollten nicht mehr als 2 °C betragen;
- Die mittlere Fruchtbarkeit der Kontrollen in jeder Generation (F0 und F1) sollte mehr als 20 Eier pro Paar pro Tag betragen. Die Fertilität aller gelegten Eier sollte während der Beurteilung mehr als 80 % betragen. Zusätzlich dazu sollten 16 der empfohlenen 24 Kontrollbrutpaare (> 65 %) mehr als 20 Eier pro Paar pro Tag legen;
- Die Schlupffähigkeit der Eier sollte bei den Kontrollen $\geq 80\%$ (Durchschnitt) betragen (in jeder der F1- und F2-Generationen);
- Das Überleben nach dem Schlüpfen bis 3 wpf und ab 3 wpf bis zum Sterben der Generation F1 (d. h. 15 wpf) sollte bei den Kontrollen $\geq 80\%$ (Durchschnitt) und $\geq 90\%$ (Durchschnitt) betragen (F1);
- es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von $\pm 20\%$ bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden;

Obwohl dies kein Validitätskriterium ist, sollten sich Replikate hinsichtlich der Wassertemperatur in einer Behandlung statistisch nicht voneinander unterscheiden und Behandlungsgruppen innerhalb des Tests sollten sich auch statistisch nicht voneinander unterscheiden (auf der Grundlage täglicher Temperaturmessungen und kurze Abweichungen ausgenommen).

9. Obwohl eine verringerte Reproduktion in den Gruppen mit einer höheren Exposition beobachtet werden kann, sollte es in mindestens der dritthöchsten Gruppe und allen niedrigeren Gruppen von F0 zu einer ausreichenden Reproduktion kommen, um die Schlüpfsinkubatoren zu füllen. Zudem sollten genügend Embryos in den Gruppen mit der dritthöchsten und den niedrigeren Expositionen in F1 überleben, um eine Endpunktbeurteilung bei der Probenahme der fast ausgewachsenen Tiere zu ermöglichen (siehe Abschnitte 36 und 38 sowie Anlage 9). Zusätzlich sollte es in der F1-Gruppe mit der zweithöchsten Exposition mindestens eine minimale Überlebenschance nach dem Schlüpfen (~20 %) geben. Dies sind keine Validitätskriterien per se, sondern Empfehlungen, damit solide NOECs berechnet werden können.
10. Wird eine Abweichung von den Testvaliditätskriterien beobachtet, sollte geprüft werden, welche Folgen dies für die Zuverlässigkeit der Testergebnisse hat, und diese Abweichungen und Erwägungen sollten in den Prüfbericht aufgenommen werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

11. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

- (a) Sauerstoff- und pH-Messgeräte;
- (b) Geräte zur Messung von Wasserhärte und Alkalität;
- (c) geeignete Apparatur zur Temperaturregelung und einer möglichst kontinuierlichen Überwachung;
- (d) Becken aus chemisch inertem Material und mit für das empfohlene Besatzverhältnis und die empfohlene Besatzdichte geeignetem Fassungsvermögen (siehe Anlage 3);
- (e) Waage mit angemessener Genauigkeit ($\pm 0,5$ mg).

Wasser

12. Als Prüfwasser kann jedes beliebige Wasser verwendet werden, in dem die Prüfspezies über einen längeren Zeitraum überleben und wachsen können. Während der gesamten Prüfdauer sollte eine konstante Wasserqualität gewährleistet sein. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Prüfergebnis nicht übermäßig beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfchemikalie) oder sich nachteilig auf die Leistung des Zuchtbestands auswirkt, sollten in Abständen Proben zur Analyse entnommen werden. Das Wasser ist auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), Pestizide, den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen (beispielsweise alle sechs Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist). Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 2 aufgeführt. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5 bis 8,5 liegen und während des Tests nicht um mehr als $\pm 0,5$ pH-Einheiten schwanken.

Expositionssystem

13. Das Design und die Materialien für das Expositionssystem werden nicht spezifiziert. Es sollte Glas, Edelstahl oder andere chemisch träge Materialien für die Konstruktion des Prüfsystems verwendet werden, das bei vorherigen Tests nicht kontaminiert wurde. Für den Zweck dieses Tests kann ein gut geeignetes Expositionssystem aus einem kontinuierlichen Durchflusssystem bestehen (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Prüflösungen

14. Die Stammlösung der Prüfchemikalie sollte mithilfe einer geeigneten Pumpe in das Expositionssystem befördert werden. Die Durchflussrate der Stammlösung sollte gemäß der analytischen Bestätigung der Prüflösungen vor der Einleitung der Exposition kalibriert und während des Tests regelmäßig volumetrisch kontrolliert werden. Die Prüflösung in jeder Kammer wird in Abhängigkeit der Prüfchemikalienstabilität und der Wasserqualität angemessen erneut (z. B. mindestens 5 Volumenerneuerungen/Tag bis 16 Volumenerneuerungen/Tag oder bis zu 20 ml/min Durchfluss).
15. Die Prüflösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einröhren der Prüfchemikalie in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (z. B. Rührwerk und/oder Ultraschall) hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen/-systeme oder passive Dosierungsmethoden (14) verwendet werden. Vorzugsweise sollten weder Lösungsmittel noch Träger verwendet werden: (1) bestimmte Lösungsmittel selbst können zu einer Toxizität und/oder unerwünschten oder unerwarteten Reaktionen führen, (2) das Prüfen von Chemikalien über ihrer Wasserlöslichkeit (wie dies oft durch die Verwendung von Lösungsmitteln passieren kann) kann zu ungenauen Bestimmungen der effektiven Konzentrationen führen, (3) die Verwendung von Lösungsmitteln bei längerfristigen Tests kann zur starken Ausprägung eines Biofilms im Zusammenhang mit mikrobieller Aktivität führen, was die Umweltbedingungen sowie die Fähigkeit, Expositionskonzentrationen beizubehalten, beeinträchtigt und (4) in Abwesenheit historischer Daten zeigt, dass das Lösungsmittel das Ergebnis der Studie nicht beeinflusst, die Verwendung von Lösungsmitteln erfordert eine Lösungsmittelkontrollbehandlung, die mit Implikationen hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere einhergeht, da zusätzliche Tiere erforderlich sind, um den Test durchzuführen. Bei schwierig zu prüfenden Chemikalien kann ein Lösungsmittel als letztes Mittel eingesetzt werden und es sollte das OECD Guidance Document 23 on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (15) herangezogen werden, um die beste Methode zu bestimmen. Die Wahl des Lösungsmittels wird durch die chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien und die Verfügbarkeit der historischen Daten zur Verwendung des Lösungsmittels bestimmt. Wenn Lösungsmittel verwendet werden, sind zusätzlich zu den Kontrollen ohne Lösungsmittel (negativ) auch geeignete Lösungsmittelkontrollen zu untersuchen (nur Verdünnungswasser). Falls diese Verwendung eines Lösungsmittels unvermeidbar ist und eine mikrobielle Aktivität (Bildung eines Biofilms) auftritt, wird während des Tests (mindestens wöchentlich) eine Aufzeichnung/Berichterstattung der Biofilmbildung pro Becken empfohlen. Idealerweise

sollte die Lösungsmittelkonzentration bei der Lösungsmittelkontrolle und allen Prüfbehandlungen konstant gehalten werden. Wenn die Konzentration des Lösungsmittels nicht konstant gehalten wird, sollte die höchste Konzentration des Lösungsmittels bei der Prüfbehandlung auch bei der Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. In Fällen, bei denen ein Lösungsmittelträger verwendet wird, sollten die maximalen Lösungsmittelkonzentrationen 100 µl/l oder 100 mg/l (15) nicht überschreiten und es wird empfohlen, die Lösungsmittelkonzentration so niedrig wie möglich zu halten (z. B. < 20 µl/l), um eine potenzielle Auswirkung des Lösungsmittels auf die gemessenen Endpunkte zu vermeiden (16).

Versuchstiere

Auswahl und Halten der Fische

16. Die Prüfspezies ist der japanische Reiskäpfling *Oryzias latipes*, da er einen kurzen Lebenszyklus besitzt und sein genetisches Geschlecht bestimmt werden kann. Obwohl andere kleine Fischarten eventuell an ein ähnliches Prüfprotokoll angepasst werden können, gelten die spezifischen Methoden und Beobachtungsendpunkte in dieser Prüfmethode nur für den japanischen Reiskäpfling (siehe Abschnitt 1). Der Reiskäpfling ist bereits induziert, sich in Gefangenschaft fortzupflanzen; für seine Kultur existieren veröffentlichte Methoden (17) (18) (19) und es sind Daten von Tests zur kurzzeitigen Letalität, zu frühen Lebensstadien und zu kompletten Lebenszyklen verfügbar (5) (6) (8) (9) (20). Alle Fische werden in einer Photoperiode mit 16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit gehalten. Die Fische werden mit lebenden Salinenkrebsen, *Artemia* spp., nauplii gefüttert, die wenn erforderlich durch im Handel erhältliches Flockenfutter ergänzt werden können. Im Handel erhältliches Flockenfutter sollte regelmäßig auf Verunreinigungen überprüft werden.
17. Solange die angemessenen Tierhaltungspraktiken befolgt werden ist kein spezifisches Kulturprotokoll erforderlich. Der Reiskäpfling kann beispielsweise bis 4 wpf in 2 l-Becken mit 240 Larven pro Becken und anschließend kann er bis 8 wpf in 2 l-Becken mit 10 Fischen pro Becken aufgezogen werden; zu diesem Zeitpunkt gehen sie in den 2 l-Becken zu Brutpaaren über.

Akklimatisierung und Auswahl der Fische

18. Die zu prüfenden Fische sollten aus einem einzigen Laborbestand stammen, der mindestens zwei Wochen vor dem Test bei ähnlicher Wasserqualität und ähnlichen Lichtverhältnissen wie im Test akklimatisiert wurde (Hinweis: Dieser Akklimatisierungszeitraum ist kein in

situ-Präexpositionszeitraum). Es wird empfohlen, dass die Prüffische aus einer Kultur im eigenen Labor entnommen werden, da der Versand von adulten Fischen stressig ist und das zuverlässige Laichen beeinträchtigen kann. Die Fische sollten während des Haltezeitraums und der Expositionphase zweimal täglich mit Salinenkrebsen nauplii gefüttert werden, die bei Bedarf mit im Handel erhältlichem Flockenfutter ergänzt werden können. Es werden mindestens 42 Brutpaare (54 Brutpaare, wenn teilweise aufgrund eines Mangels an historischen Daten zur Unterstützung der ausschließlichen Lösungsmittelkontrolle eine Lösungsmittelkontrolle erforderlich ist) als erforderlich erachtet, um diesen Test einzuleiten, um eine ausreichende Replikation zu gewährleisten. Zusätzlich dazu sollte jedes Brutpaar von F0 als XX-XY verifiziert werden (d. h. normale Ergänzung der Geschlechtschromosome in jedem Geschlecht), um den möglichen Einschluss von spontanen XX-Männchen zu vermeiden (siehe Abschnitt 39).

19. Während der Akklimatisierungsphase sollten die Mortalitäten der Kulturfische aufgezeichnet und die folgenden Kriterien während eines 48-stündigen Ansiedlungszeitraums angewandt werden:
 - Mortalitäten von mehr als 10 % der Kulturpopulation innerhalb von sieben Tagen vor der Übertragung zum Prüfsystem: Austausch des gesamten Besatzes;
 - bei einer Mortalität zwischen 5 % und 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen vor der Übertragung zum Prüfsystem: weitere sieben Tage Akklimatisation zusätzlich zum 2-wöchigen Akklimatisierungszeitraum; bei einer Mortalität innerhalb der folgenden sieben Tage von über 5 %: Austausch des gesamten Besatzes;
 - Mortalitäten von weniger als 5 % der Population innerhalb von sieben Tagen vor der Übertragung zum Prüfsystem: Annahme des Besatzes.
20. Die Fische sollten im zweiwöchigen Akklimatisierungszeitraum vor dem Test und während des Expositionzeitraums keine Behandlung für Krankheiten erhalten und eine Behandlung von Krankheiten sollte wenn möglich komplett vermieden werden. Fische mit klinischen Anzeichen einer Erkrankung sollten nicht in die Studie aufgenommen werden. Es sollte während des Kulturzeitraums vor dem Test eine Aufzeichnung der Beobachtungen sowie der prophylaktischen und therapeutischen Krankheitsbehandlungen gepflegt werden.
21. Die Expositionphase sollte mit sexuell dimorphen, genetisch stimulierten adulten Fischen aus einem Laborbestand geschlechtsreifer Tiere, die bei $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ gezüchtet wurden, begonnen werden. Die Fische sollten in der Woche vor der Exposition als bewährte Brüter (d. h. sie haben lebensfähige Nachkommen gezeugt) identifiziert werden. Bei der gesamten

Gruppe der in diesem Test verwendeten Fische sollte das individuelle Gewicht nach Geschlecht im Bereich von $\pm 20\%$ des arithmetischen Mittelgewichts der Fische gleichen Geschlechts liegen. Vor dem Test sollte eine Teilprobe gewogen werden, um das mittlere Gewicht einzuschätzen. Die ausgewählten Fische sollten mindestens 12 wpf sein und ≥ 300 mg (Weibchen) und ≥ 250 mg (Männchen) wiegen.

VERSUCHSPLAN

Prüfkonzentrationen

22. Es wird empfohlen, fünf Chemikalienkonzentrationen plus Kontrolle(n) zu verwenden. Alle Informationsquellen sollten bei der Auswahl des Bereichs der Prüfkonzentrationen berücksichtigt werden, einschließlich quantitativer Strukturaktivitätsbeziehungen (QSARs), Analogien aus Analogen, Ergebnissen von Fischtests wie akuten Mortalitätstests (Kapitel C.1 dieses Anhangs), kurzzeitiger Reproduktionstests für Fische (Kapitel C.48 dieses Anhangs) und anderer Prüfmethoden, z. B. Kapitel C.15, C.37, C.41, C.47 oder C.49 dieses Anhangs (21) (22) (23) (24) (25) (26) falls verfügbar oder falls erforderlich auf einer Bereichsfindungsprüfung, die möglicherweise eine Reproduktionsphase mit einschließt. Bei Bedarf kann die Bereichsfindungsprüfung unter ähnlichen Bedingungen (Wasserqualität, Prüfsystem, Tierbesatz) wie denen für den definitiven Test durchgeführt werden. Wenn die Verwendung eines Lösungsmittels erforderlich ist und keine historischen Daten verfügbar sind, kann die Bereichsfindungsprüfung dazu verwendet werden, die Eignung des Lösungsmittels zu identifizieren. Die höchste Prüfkonzentration sollte die Wasserlöslichkeit, 10 mg/l oder 1/10. von 96h-LC50 nicht überschreiten (27). Die niedrigste Konzentration sollte um einen Faktor von 10 bis 100 niedriger sein als die höchste Konzentration. Die Verwendung von fünf Konzentrationen in diesem Test ermöglicht nicht nur die Messung der Dosis-Reaktion-Beziehungen, sondern bietet auch die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und NOEC, die zur Risikobeurteilung in regulatorischen Programmen oder Gerichtsbarkeiten erforderlich sind. Allgemein beträgt der Abstandsfaktor zwischen den Nennkonzentrationen der Prüfchemikalie zwischen nebeneinander liegenden Konzentrationsniveaus $\leq 3,2$.

Replikate innerhalb der Behandlungsgruppen und Kontrollen

23. Es sollten mindestens sechs Replikate der Prüfkammern pro Prüfkonzentration verwendet werden (siehe Anlage 7). Während der reproduktiven Phase (F0-Generation ausgenommen)

wird die Replikationsstruktur für die Fruchtbarkeitsbewertung verdoppelt und jedes Replikat verfügt nur über ein Brutpaar (siehe Abschnitt 42).

24. Zusätzlich zu den Prüfkonzentrationen werden eine Kontrolle mit Wasser und falls erforderlich eine Lösungsmittelkontrolle notwendig. Es sollte eine doppelte Anzahl der Replikatkammern für die Kontrollen verwendet werden, um eine angemessene statistische Aussagekraft zu gewährleisten (d. h. es sollten mindestens zwölf Replikate für die Kontrollen verwendet werden). Während der reproduktiven Phase wird die Anzahl der Replikate in den Kontrollen verdoppelt (d. h. mindestens 24 Replikate und jedes Replikat besitzt nur ein Brutpaar). Nach der Reproduktion sollten die Kontrollreplikate nicht mehr als 20 Embryos (Fische) enthalten.

VERFAHREN

Einleitung des Tests

25. Die geschlechtsreifen adulten Fische, die zum Start der F0-Generation des Tests verwendet werden, werden basierend auf zwei Kriterien ausgewählt: Alter (normalerweise älter als 12, aber es wird nicht empfohlen, 16 wpf zu überschreiten) und Gewicht (sollte für Weibchen ≥ 300 mg und für Männchen ≥ 250 mg betragen).
26. Paare aus Weibchen und Männchen, die die obigen Spezifikationen erfüllen, werden als individuelle Paare in jedes Beckenreplikat übersiedelt, d. h. zwölf Replikate bei den Kontrollen und sechs Replikate bei chemischen Behandlungen zu Beginn des Tests. Diesen Becken wird nach dem Zufallsprinzip eine Behandlung (z. B. T1-T5 und Kontrolle) und ein Replikat zugewiesen (z. B., A-L bei den Kontrollen und A-F bei der Behandlung) und dann werden sie mit dem entsprechenden Durchfluss in jeden Tank im Expositionssystem platziert.

Expositionsbedingungen

27. Eine vollständige Zusammenfassung der Prüfparameter und Bedingungen findet sich in Anlage 3. Die Beachtung dieser Spezifikationen sollte zu Kontrollfischen mit Endpunktwerten führen, die denen in Anlage 4 ähnlich sind.
28. Während des Tests sollten der gelöste Sauerstoff, der pH-Wert und die Temperatur in mindestens einem Prüfgefäß jeder Behandlungsgruppe und der Kontrolle gemessen werden. Diese Messungen, mit Ausnahme der Temperaturmessung, sollten während der

Expositionsdauer mindestens einmal pro Woche durchgeführt werden. Die mittlere Wassertemperatur über die gesamte Studiendauer hinweg sollte während des Tests zwischen 24 und 26 °C liegen. Die Temperatur sollte während der Expositionsdauer jeden Tag gemessen werden. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5 bis 8,5 liegen und während des Tests nicht um mehr als $\pm 0,5$ pH-Einheiten schwanken. Replikate sollten sich in einer Behandlung statistisch nicht voneinander unterscheiden und Behandlungsgruppen innerhalb des Tests sollten sich auch statistisch nicht voneinander unterscheiden (basierend auf täglichen Temperaturmessungen und kurze Abweichungen ausgenommen).

Expositionsdauer

29. Beim Test werden geschlechtsreife Fische aus F0 drei Wochen lang exponiert. In Woche 4 um den Prüftag 24 herum wird F1 etabliert und die F0-Brutpaare werden schmerzfrei getötet und ihr Gewicht und ihre Länge aufgezeichnet (siehe Abschnitt 34). Darauf folgt eine Exposition der F1-Generation für 14 weitere Wochen (insgesamt 15 Wochen für F1) und der F2-Generation für zwei Wochen bis zum Schlüpfen. Die Gesamtdauer des Tests beträgt primär 19 Wochen (d. h. bis zum Schlüpfen von F2). Die Fristen für den Test werden in Tabelle 2 dargestellt und in Anlage 9 genauer erläutert.

Fütterungsregime

30. Die Fische können mit lebenden Salinenkrebsen, *Artemia* spp. (24 Stunden alte nauplii) ad libitum gefüttert werden, die wenn erforderlich durch im Handel erhältliches Flockenfutter ergänzt werden können. Im Handel erhältliches Flockenfutter sollte regelmäßig auf Verunreinigungen wie chlororganische Pestizide, polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) untersucht werden. Futter mit einem hohen Gehalt an Stoffen mit endokriner Wirkung (d. h. Phytoöstrogene), die die Testwirkung beeinträchtigen könnten, sollte vermieden werden. Nicht aufgenommenes Futter und Fäkalien sind bei Bedarf aus den Prüfgefäßen zu entfernen (etwa durch vorsichtiges Absaugen vom Beckenboden). Die Seiten und der Boden jedes Beckens sollte auch mindestens ein- oder zweimal pro Woche gereinigt werden (z. B. durch Abkratzen mit einem Spachtel). Ein Beispiel für einen Fütterungsplans findet sich in Anlage 5. Die Fütterungsrate basiert auf der Anzahl der Fische pro Replikat. Deshalb wird die Fütterungsrate reduziert, wenn Mortalitäten in einem Replikat auftreten.

Analytische Bestimmungen und Messungen

31. Vor Beginn der Exposition ist zu überprüfen, ob die Chemikalienbeschickung einwandfrei funktioniert. Es dürfen ausschließlich anerkannte Analysemethoden angewandt werden, und die Stabilität der Chemikalie im Prüfsystem muss hinreichend bekannt sein. Während des Tests werden die Konzentrationen der Prüfchemikalie in angemessenen Intervallen bestimmt, vorzugsweise mindestens einmal pro Woche in einem Replikat für jede Behandlungsgruppe, wobei jede Woche zwischen Replikaten derselben Behandlungsgruppe abgewechselt wird.
32. Während des Tests sollten die Durchflussraten von Verdünnungsmittel und Stammlösung in entsprechenden Intervallen überprüft werden (z. B. mindestens dreimal pro Woche). Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während des gesamten Tests jedoch zufriedenstellend innerhalb der gemessenen Mittelwerte ($\pm 20\%$) gehalten, so können sich die Ergebnisse auf die nominalen oder die gemessenen Werte beziehen. Im Falle von Chemikalien, die sich deutlich in Fischen anhäufen, können sich die Prüfkonzentrationen verringern, während die Fische wachsen. In solchen Fällen wird empfohlen, dass die Erneuerungsrate der Prüflösung in jeder Kammer angepasst wird, um die Prüfkonzentrationen so konstant wie möglich zu halten.

Beobachtungen und gemessene Endpunkte

33. Die gemessenen Endpunkte umfassen Fruchtbarkeit, Fertilität, Schlüpfen, Wachstum und Überleben für die Bewertung der möglichen Auswirkungen auf Ebene der Population. Das Verhalten sollten ebenfalls täglich beobachtet und ungewöhnliches Verhalten notiert werden. Andere mechanistische Endpunkte umfassen hepatische *vtg* mRNA oder VTG Proteingehalte durch ein Immunoassay (28), sexuelle phänotypische Marker wie die charakteristische männliche Afterflossen-Papille, die histologische Bewertung des gonadalen Geschlechts und die histopathologische Bewertung von Niere, Leber und Gonaden (siehe Liste mit Endpunkten in Tabelle 1). All diese spezifischen Endpunkte werden im Kontext einer Bestimmung des genetischen Geschlechts der einzelnen Fische bewertet, basierend auf dem Vorhandensein oder dem Fehlen des Gens *dmy*, das das männliche Geschlecht des Reiskärpflings bestimmt (siehe Abschnitt 41). Zusätzlich dazu wird die Zeit bis zum Laichen ebenfalls bewertet. Außerdem können mithilfe der Informationen aus der Anzahl der Afterflossen-Papillen einfache phänotypische Geschlechtsverhältnisse abgeleitet werden, um die einzelnen Reiskärpflinge entweder als phänotypisch männlich oder weiblich zu definieren. Von dieser Prüfmethode wird nicht erwartet, dass sie mäßige Abweichungen vom erwarteten Geschlechtsverhältnis erkennt, da die relativ kleine Anzahl der Fische pro Replikat keine ausreichende statistische

Aussagekraft bietet. Während der histopathologischen Bewertung wird auch die Gonade bewertet und es werden viel leistungsstärkere Analysen zur Beurteilung des Gonadenphänotyps im Kontext des genetischen Geschlechts durchgeführt.

34. Der Hauptzweck dieser Prüfmethode ist die Bewertung der potenziellen populationsrelevanten Effekte einer Prüfchemikalie. Mechanistische Endpunkte (VTG, SSCs und bestimmte gonadale Histopathologie-Effekte) können ebenfalls dabei helfen, zu bestimmen, ob ein Effekt über eine endokrine Aktivität vermittelt wird. Diese mechanistischen Endpunkte können auch von systemischen und anderen Toxizitäten beeinflusst werden. Folglich können auch die Histopathologien von Leber und Niere gründlich bewertet werden, um dabei zu helfen, Reaktionen in mechanistischen Endpunkten besser zu verstehen. Wenn diese detaillierten Bewertungen jedoch nicht vorgenommen werden, sollten deutliche Abnormalitäten, die beiläufig bei der histopathologischen Bewertung beobachtet werden, trotzdem notiert und gemeldet werden.

Schmerzfreies Töten

35. Bei Beendigung der Exposition von Generation F0 und F1, wenn eine Teilstichprobe von subadulten Fische genommen wird, sollte der Fisch mit den erforderlichen Mengen an anästhetischer Lösung (z. B. Tricainmethansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) gepuffert mit 300 mg/l NaHCO₃ (Natriumbicarbonat, CAS.144-55-8) getötet werden, um die Reizung der Schleimhäute zu verringern. Wenn die Fische Anzeichen dafür zeigen, dass sie ziemlich leiden (sehr schwer und der Tod kann zuverlässig vorausgesagt werden) und sie als sterbend angesehen werden, dann sollten die Tiere betäubt und getötet und für die Datenanalyse als Mortalität behandelt werden. Wenn ein Fisch aufgrund von Morbidität getötet wird, sollte dies notiert und gemeldet werden. Je nachdem, wann der Fisch während der Studie getötet wurde, kann er für eine histopathologische Analyse behalten werden (Fixierung des Fisches für mögliche Histopathologie).

Umgang mit Eiern und larvalen Fischen

Sammeln von Eiern von Brutpaaren, um die nächste Generation zu propagieren

36. Das Sammeln der Eier erfolgt am ersten Tag (oder den ersten zwei Tagen, wenn erforderlich) der Prüfwoche 4, um von F0 zu F1 und Prüfwoche 18, um von F1 zu F2 überzugehen. Prüfwoche 18 entspricht F1, 15 wpf (Wochen nach der Befruchtung) adulte Fische. Es ist wichtig, dass alle Eier am Tag vor Beginn des Eiersammelns aus jedem Becken entfernt werden, um sicherzustellen, dass alle Eier, die von einem Brutpaar

gesammelt wurden, aus einem einzigen Laich stammen. Nach dem Ablaichen tragen weibliche Reiskäpfplinge ihre Eier nahe ihres Rumpfes, bis die Eier auf ein Substrat abgegeben werden können. Ohne Substrat im Becken können die Eier entweder am Weibchen oder am Beckenboden gefunden werden. Je nach ihrer Position werden die Eier in Prüfwoche 4 von F0 und Prüfwoche 18 von F1 entweder vorsichtig vom Weibchen entfernt oder vom Boden gefiltert. Alle in einer Behandlung gesammelten Eier werden vor der Verteilung auf Inkubationskammern gepoolt.

37. Eierfasern, die die abgelaichten Eier zusammenhalten, sollten entfernt werden. Befruchtete Eier (bis zu 20) werden von jedem Brutpaar gesammelt (1 Paar pro Replikat), nach Behandlung gepoolt und systematisch auf geeignete Inkubationskammern verteilt (Anlage 6, 7). Mithilfe eines qualitativ hochwertigen Stereomikroskops kann man Kennzeichen für die frühe Befruchtung/Entwicklung sehen, wie beispielsweise das Anheben der Befruchtungsmembran (Chorion), laufende Zellteilungen oder die Bildung der Blastula. Die Inkubatorkammern können in unterschiedliche „Inkubatoraquarien“ gelegt werden, die für jede Behandlung aufgestellt wurden (in welchem Fall die Wasserqualitätsparameter und die Prüfchemikalienkonzentrationen in ihnen gemessen werden müssen), oder im Replikataquarium, in dem sich die geschlüpften Larven (z. B. Eleutheroembryo) befinden werden. Wenn ein zweiter Sammlungstag (Prüftag 23) erforderlich ist, sollten alle Eier von beiden Tagen gepoolt und dann systematisch erneut auf die behandelten Replikate verteilt werden.

Aufzucht der Eier bis zum Schlüpfen

38. Die befruchteten Eier werden stets angeregt, z. B. im Eierinkubator durch Luftblasen oder durch vertikales Schwingen des Eierinkubators. Die Mortalitäten der befruchteten Eier (Embryos) werden täglich kontrolliert und aufgezeichnet. Tote Eier werden aus den Inkubatoren entfernt (Anlage 9). Am 7. Tag nach der Befruchtung (dpf) wird die Anregung gestoppt oder reduziert, sodass sich die befruchteten Eier auf den Boden des Inkubators absetzen können. Dies fördert das Schlüpfen, das dann normalerweise am nächsten oder übernächsten Tag erfolgt. Bei jeder Behandlung und Kontrolle werden die Jungtiere (junge Larven; Eleutheroembryo) gezählt (gepoolte Replikatbasis). Befruchtete Eier, die bis zum Doppelten des medianen Schlüpftags bei der Kontrolle (normalerweise 16 oder 18 dpf) noch nicht geschlüpft sind, werden als nicht lebensfähig angesehen und entsorgt.
39. Zwölf Jungtiere werden in jedes Replikatbecken gegeben. Die Jungtiere aus den Inkubationskammern werden gepoolt und systematisch auf die Replikatbecken verteilt (Anlage 7). Dies kann über die zufällige Auswahl eines Jungtiers aus dem Behandlungs pool und dem nachfolgenden Hinzufügen eines Jungtiers zu einem Replikataquarium in einer

nicht diskriminierenden Ziehung erfolgen. Jedes der Becken sollte eine gleiche Anzahl ($n = 12$) an geschlüpften Larven enthalten (maximal jeweils 20 Larven). Wenn es nicht genug Jungtiere gibt, um alle behandelten Replikate zu füllen, dann wird empfohlen, sicherzustellen, dass so viele Replikate wie möglich über 12 Jungtiere verfügen. Jungtiere können sicher mit Glaspipetten mit großer Öffnung gehandhabt werden. Zusätzliche Jungtiere werden mit Anästhetikum schmerzfrei getötet. Während der paar Wochen vor der Bildung der Brutpaare sollte der Tag, an dem das erste Laichereignis in jedem Replikat beobachtet wurde, aufgezeichnet werden.

Bildung der Brutpaare

Flossenabtrennung und Bestimmung des genotypischen Geschlechts

40. Die Bestimmung des genotypischen Geschlechts über die Abtrennung der Flosse erfolgt bei 9–10 wpf (d. h. Prüfwoche 12–13 für die F1-Generation). Alle Fische in einem Becken werden betäubt (mithilfe zulässiger Methoden, z. B. IACUC) und eine kleine Gewebeprobe wird entweder von der dorsalen oder ventralen Spitze der Schwanzflosse jedes Fischs entnommen, um das genotypische Geschlecht des Tiers zu bestimmen (29). Die Fische aus einem Replikat können in kleinen Käfigen – wenn möglich ein Fisch pro Käfig – im Replikatbecken gehalten werden. Alternativ können zwei Fische in einem Käfig gehalten werden, wenn sie voneinander unterscheidbar sind. Eine Methode, um sie zu unterscheiden, ist das Abtrennen der Schwanzflosse (z. B. dorsale im Vergleich zur ventralen Spitze) bei der Entnahme der Gewebeprobe.
41. Das genotypische Geschlecht des Reiskärpflings kann über ein identifiziertes und sequenziertes Gen (*dmy*) bestimmt werden, das sich auf dem Y-Chromosom befindet. Das Vorhandensein eines *dmy*-Gens ist unabhängig vom Phänotyp als Beleg für das Vorliegen eines XY-Tieres anzunehmen; entsprechend ist das Fehlen des *dmy*-Gens unabhängig vom Phänotyp als Beleg für das Vorliegen eines XX-Tieres anzunehmen (30); (31). Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird bei jeder Flossenabtrennung extrahiert und das Vorhandensein oder Fehlen von *dmy* kann anhand einer Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt werden (siehe Anlage 9 in Kapitel C.41 dieses Anhangs oder Anlage 3 und 4 in (29)).

Bildung der Brutpaare

42. Die Informationen zum genotypischen Geschlecht werden verwendet, um XX-XY-Brutpaare zu bilden; unabhängig von den äußeren Phänotypen, die durch eine Exposition gegenüber

einer Prüfchemikalie verändert werden könnten. Am Tag, nachdem das genotypische Geschlecht jedes Fischs bestimmt wurde, werden zwei XX-Fische und zwei XY-Fische aus jedem Replikat nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und zwei XX-XY-Brutpaare gebildet. Wenn ein Replikat nicht entweder zwei XX- oder zwei XY-Fische hat, dann sollten angemessene Fische aus anderen behandelten Replikaten genommen werden. Die Priorität liegt darin, die empfohlene Anzahl an Replikatbrutpaaren (12) in jeder Behandlung und in den Kontrollen (24) zu haben. Fische mit offensichtlichen Abnormalitäten (Schwimmblasenprobleme, Missbildungen der Wirbelsäule, extreme Größenvariationen, usw.) würden bei der Bildung der Brutpaare ausgeschlossen werden. Während der Fortpflanzungsphase für F1 sollte jedes Replikatbecken nur ein Brutpaar enthalten.

Probenahme von subadulten Fischen und Endpunktbewertung

Probenahme von nicht brütenden Fischen

43. Nach der Bildung der Brutpaare werden die Fische, die nicht für eine weitere Züchtung ausgewählt wurden, zur Messung der subadulten Endpunkte in Prüfwoche 12–13 schmerzfrei getötet (F1). Es ist extrem wichtig, dass die Fische so gehandhabt werden, dass das genotypische Geschlecht für die Brutpaarauswahl noch immer auf einen individuellen Fisch nachverfolgt werden kann. Alle gesammelten Daten werden im Kontext des genotypischen Geschlechts der spezifischen Fische untersucht. Jeder Fisch wird für eine Vielzahl von Endpunktmessungen verwendet, einschließlich: Bestimmung der Überlebensraten von Jungtieren/subadulten Fischen (Prüfwochen 7–12/13 (F1), Wachstum in Länge (die Standardlänge könnte gemessen werden, wenn die Schwanzflosse aufgrund der Probenahme für die genetische Geschlechtsanalyse gekürzt wurde. Die Gesamtlänge kann gemessen werden, wenn nur von einem Teil der Schwanzflosse, dorsal oder ventral, eine Probe für *dmy* genommen wird) und Körpermasse (d. h. Nassgewicht, trocken getupft), Leber *vtg* mRNA (oder VTG) und Afterflossen-Papille (siehe Tabellen 1 und 2). Bitte beachten, dass Gewichte und Längen der Brutpaare ebenfalls zur Berechnung des mittleren Wachstums in einer Behandlungsgruppe erforderlich sind.

Gewebeprobennahme und Vitellogenin-Messung

44. Die Leber wird seziert und sollte bei $\leq -70^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, bis die *vtg* mRNA (oder VTG) gemessen wird. Der Schwanz des Fischs, einschließlich der Schwanzflosse, wird in einer angemessenen Fixierlösung aufbewahrt (z. B. Davidson) oder fotografiert, damit die Afterflossen-Papillen später gezählt werden können. Falls gewünscht, könnte zu diesem Zeitpunkt von anderen Gewebearten (d. h. Gonaden) eine Probe genommen und diese

aufbewahrt werden). Die Konzentration des Leber-VTG sollte mit einer homologen ELISA-Technik quantifiziert werden (siehe die empfohlenen Verfahren für Reiskäpfplinge in Anlage 6 in Kapitel C.48 dieses Anhangs). Alternativ wurden die Methoden für die *vtg*-mRNA-Quantifizierung, d. h. *vtg I*-Gen mRNA-Extrahierung aus einer Leberprobe und Quantifizierung der Anzahl an Kopien des *vtg I*-Gene (pro ng der gesamten mRNA) durch quantitative PCR, von der U.S EPA (29) etabliert. Anstatt die Anzahl der Kopien des *vtg*-Gens in den Kontroll- und Behandlungsgruppen zu bestimmen, besteht eine ressourcenschonendere und technisch weniger schwierige Methode darin, die relative (vielfache) Änderung der *vtg I*-Expression aus Kontroll- und Behandlungsgruppen zu bestimmen.

Sekundäre Geschlechtsmerkmale

45. Unter normalen Bedingungen besitzen nur geschlechtsreife männliche Reiskäpflinge Papillen, die sich auf den verbundenen Platten bestimmter Afterflossenstacheln als sexuelle Geschlechtsmerkmale entwickeln und einen potenziellen Biomarker für endokrinwirksame Effekte bieten. Die Methode des Zählens von Afterflossen-Papillen (die Anzahl der verbundenen Platten mit Papillen) wird in Anlage 8 beschrieben. Es wird auch die Anzahl der Afterflossen-Papillen pro Tier verwendet, um dieses Tier als äußerlich phänotypisches Männchen oder Weibchen zu kategorisieren, um ein einfaches Geschlechtsverhältnis pro Replikat zu berechnen. Ein Reiskäpfling mit einer Anzahl von mehr als 0 wird als Männchen definiert; ein Reiskäpfling mit 0 Afterflossen-Papillen wird als Weibchen definiert.

Beurteilung der Fruchtbarkeit und Fertilität

46. Fruchtbarkeit und Fertilität werden in den Prüfwochen 1 bis 3 in der F0-Generation und in den Prüfwochen 15 bis 17 in der F1-Generation bewertet. Die Eier werden 21 aufeinanderfolgende Tage lang täglich von jedem Brutpaar gesammelt. Die Eier werden jeden Morgen sanft von den mit dem Netz gefangenen Weibchen entfernt und/oder vom Boden des Aquariums genommen. Sowohl Fruchtbarkeit als auch Fertilität werden jeden Tag für jedes Replikatbrutpaar aufgezeichnet. Die Fruchtbarkeit wird als die Anzahl der abgelaichten Eier definiert und die Fertilität wird funktionell als die Anzahl an befruchteten und lebensfähigen Eiern zum Zeitpunkt des Zählens definiert. Das Zählen sollte so bald wie möglich nach dem Sammeln der Eier erfolgen.
47. Die Fruchtbarkeit der Replikate wird jeden Tag als die Anzahl der Eier pro Brutpaar aufgezeichnet, das durch die empfohlenen statistischen Verfahren mithilfe der

Replikatmittelwerte analysiert wird. Die Fertilität der Replikate ist die Summe der Anzahl der lebensfähigen Eier, die von einem Brutpaar produziert werden, geteilt durch die Summe der Anzahl der Eier, die durch dieses Paar produziert wurden. Statistisch gesehen wird die Fertilität als Verhältnis pro Replikat analysiert. Die Schlupffähigkeit der Replikate ist die Anzahl an Embryos geteilt durch die Anzahl an Embryos im Inkubator (normalerweise 20). Statistisch gesehen wird die Schlupffähigkeit als Verhältnis pro Replikat analysiert.

Probenahme von adulten Fischen und Endpunktbewertung

Probenahme von Brutpaaren

48. Nach Prüfwoche 17 (d. h. nachdem die F2-Generation erfolgreich begonnen hat) werden die adulten F1-Fische schmerzfrei getötet und verschiedene Endpunkte bewertet (siehe Tabellen 1 und 2). Von der Schwanzflosse und/oder dem Schwanz wird zur Bewertung der Afterflossen-Papille kurz nach dem Rumpf ein Bild angefertigt (siehe Anlage 8); sie wird entfernt und zum späteren Zählen der Papillen fixiert. Es kann eine Probe von einem Teil der Schwanzflosse genommen und diese falls gewünscht zur Verifizierung des genetischen Geschlechts (*dmy*) archiviert werden. Wenn erforderlich kann eine Gewebeprobe genommen werden, um die *dmy*-Analyse zur Verifizierung des genetischen Geschlechts des spezifischen Fischs zu wiederholen. Die Körperhöhle wird geöffnet, um eine Perfusion mit den angemessenen Fixierlösungen (z. B. Davidson) zu ermöglichen, bevor der gesamte Körper in die Fixierlösung getaucht wird. Wenn jedoch vor der Fixierung ein angemessener Permeabilisierungsschritt durchgeführt wird, muss die Körperhöhle nicht geöffnet werden.

Histopathologie

49. Jeder Fisch wird histologisch auf die Pathologie im Gonadengewebe bewertet (30); (29). Wie in Abschnitt 33 angeführt, könnten andere in diesem Test bewertete mechanistische Endpunkte (d. h. VTG, SSCs und bestimmte gonadale Histopathologieeffekte) von systemischen oder anderen Toxizitäten beeinflusst werden. Folglich können auch die Histopathologien von Leber und Niere gründlich bewertet werden, um dabei zu helfen, Reaktionen in mechanistischen Endpunkten besser zu verstehen. Wenn diese detaillierten Bewertungen jedoch nicht vorgenommen werden, sollten deutliche Abnormalitäten, die beiläufig bei der histopathologischen Bewertung beobachtet werden, trotzdem notiert und gemeldet werden. Das Lesen nach unten von der höchsten Behandlungsgruppe (im Vergleich zur Kontrolle) bis zu einer Behandlung ohne Effekt könnte berücksichtigt werden, allerdings wird empfohlen, die Histopathologieleitlinien zu lesen (29). Normalerweise werden alle Proben verarbeitet/unterteilt, nachdem sie vom Pathologen gelesen wurden.

Wenn ein Ansatz des Lesens nach unten angewandt wird, muss beachtet werden, dass das Verfahren Rao-Scott Cochrane-Armitage nach Scheiben (RSCABS) die Erwartung nutzt, dass sich die biologische Auswirkung (die Pathologie) mit steigender Dosis ebenfalls erhöht. Deshalb wird die Aussagekraft verloren, wenn nur eine einzige hohe Dosis ohne Zwischendosen berücksichtigt wird. Wenn keine statistische Analyse erforderlich ist, um zu bestimmen, dass die hohe Dosis keinen Effekt hat, kann dieser Ansatz eventuell annehmbar sein. Der Gonadenphototyp wird ebenfalls von dieser Bewertung abgeleitet

Sonstige Beobachtungen

50. Der MEOGRT bietet Daten, die benutzt werden können (z. B. in einem Ansatz der Beweiskraft der Daten), um gleichzeitig mindestens zwei allgemeine Arten an AOPs zu bewerten, die in einer reproduktiven Einschränkung enden: (a) endokrin-vermittelte Wege, die eine Störung der endokrinen Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse umfassen; und (b) Wege, die eine Reduzierungen des Überlebens, des Wachstums (Länge und Gewicht) und der Fortpflanzung durch eine nicht-endokrin vermittelte Toxizität verursachen. Normalerweise sind in chronischen Toxizitätstests gemessene Endpunkte wie der Test des vollständigen Lebenszyklus und der Test im frühen Lebensstadium auch in diesem Test enthalten und können verwendet werden, um die Gefahren aufgrund nicht-endokrin vermittelter toxischer Wirkweisen und endokrin vermittelter Toxizitätswege zu bewerten. Während des Tests sollte das Verhalten täglich beobachtet und ungewöhnliches Verhalten notiert werden. Zusätzlich sollten Mortalitäten aufgezeichnet und das Überleben bis zum Töten des Fischs (Prüfwoche 6/7), das Überleben, nachdem die subadulte Stichprobe getötet wurde, bis zur subadulten Probenahme (9-10 wpf) und das Überleben von Paaren bis zur Probenahme der adulten Fische berechnet werden.

Tabelle 1: Endpunktüberblick zum MEOGRT*

Lebensstadium	Endpunkt	Generation
Embryo (2 wpf)	Schlüpfen (% und Zeit bis zum Schlüpfen)	F1, F2
Jungfisch (4 wpf)	Überleben	F1
Subadulter	Überleben	F1

Fisch (9 oder 10 wpf)	Wachstum (Länge und Gewicht)	
	Vitellogenin (mRNA oder Protein)	
	Sekundäre Geschlechtsmerkmale (Afterflossen-Papille)	
	Externes Geschlechterverhältnis	
	Zeit bis 1. Laichen	
Adulter Fisch (12–14 wpf)	Reproduktion (Fruchtbarkeit und Fertilität)	F0, F1
Adulter Fisch (15 wpf)	Überleben	F1
	Wachstum (Länge und Gewicht)	
	Sekundäre Geschlechtsmerkmale (Afterflossen-Papille)	
	Histopathologie (Gonaden, Leber, Niere)	

*Diese Endpunkte müssen statistisch analysiert werden

ZEITLEISTE

51. Eine in Tabelle 2 dargestellte Zeitleiste für den MEOGRT zeigt der Test. Der MEOGRT umfasst 4 Wochen Exposition gegenüber adulten F0-Tieren und 15 Wochen Exposition gegenüber der F1-Generation sowie die Expositionsduer für die zweite Generation (F2) bis zum Schlüpfen (2 wpf). Aktivitäten im Verlauf des MEOGRT werden in Anlage 9 zusammengefasst.

Tabelle 2: Expositions- und Messendpunktfristen für MEOGRT.

MEOGRT Expositions- und Endpunktfrist																						
F0	1	2	3	4																		
F1			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15					
F2																	1	2				
Prüfwoche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
Schlüssel zum Lebensstadium	Embryo				Larve				Jungfisch				Subadulter Fisch		Adulter Fisch							
Endpunkte																						
Fruchtbarkeit	F ₀								F ₁								<ul style="list-style-type: none"> • Der Versuchsplan hat 7 Replikatgruppen <ul style="list-style-type: none"> ◦ 5 für Behandlungen mit Prüfchemikalien ◦ 2 für Kontrollbehandlungen (4, wenn Lösungsmittel verwendet werden) • Innerhalb des Gruppenplans <ul style="list-style-type: none"> ◦ 12 Replikate für die Reproduktion, Pathologie und SSC bei adulten Fischen (Wochen 10 bis 18) ◦ 6 Replikate zum Schlüpfen, Überleben, Vtg; und - SSC und Wachstum subadulter Fische (Wochen 1 bis 9) <p>SSC: sekundäre Geschlechtsmerkmale; Vtg: Vitellogenin</p>					
Fertilität	F ₀								F ₁													
Schlüpfen	F ₁												F ₂									
Überleben	F ₁								F ₁								F ₁					
Wachstum	F ₀								F ₁								F ₁					
Vitellogenin									F ₁													
Sekundäres Geschlecht									F ₁								F ₁					
Histopathologie																	F ₁					
Prüfwoche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			

BERICHTERSTATTUNG

Statistische Analyse

52. Da das genotypische Geschlecht für alle Prüffische bestimmt wird, sollten die Daten für jedes genotypische Geschlecht separat analysiert werden (d. h. XY-Männchen und XX-Weibchen). Das Nichtbeachten dieser Regel reduziert die statistische Aussagekraft der Analysen erheblich. Statistische Datenanalysen sollten nach den Verfahren im OECD-Dokument „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance

to Application“ (32) durchgeführt werden. Anlage 10 bietet weitere Hilfestellungen zur statistischen Analyse.

53. Der Versuchsplan und die gewählte Statistikmethode sollten eine ausreichende statistische Aussagekraft besitzen, damit Änderungen von biologischer Bedeutung bei den Endpunkten erkannt werden können, für die eine NOEC anzugeben ist (32). Die Angabe der Konzentrationen und Parameter, bei denen relevante Wirkungen auftreten, kann vom jeweiligen Rechtsrahmen abhängen. Die prozentuale Änderung sollte bei jedem Endpunkt festgestellt werden, der nachgewiesen oder geschätzt werden muss. Der Versuchsaufbau sollte entsprechend angepasst werden. Da es unwahrscheinlich ist, dass derselbe Prozentsatz bei allen Endpunkten zutrifft oder dass ein durchführbarer Versuch geplant werden kann, der diese Kriterien bei allen Endpunkten erfüllt, sollte man sich bei der Versuchsplanung auf die Endpunkte konzentrieren, die für den jeweiligen Versuch von Bedeutung sind. Die Flussdiagramme und Leitlinien für die statistische Vorgehensweise sind der Anlage 10 zu entnehmen und können bei der Auswertung der Daten und bei der Wahl der am besten geeigneten statistischen Methode oder des zu verwendenden Modells als Leitlinie herangezogen werden. Es können andere statistische Ansätze angewandt werden, sofern sie wissenschaftlich begründet sind.
54. Streuungen innerhalb jeder Reihe von Replikaten müssen durch Varianzanalyse oder Kontingenztabellenverfahren analysiert werden, und es müssen ausreichend geeignete statistische Analysemethoden basierend auf dieser Analyse angewandt werden. Um einen mehrfachen Vergleich zwischen den Ergebnissen bei den individuellen Konzentrationen und denen für die Kontrollen zu ziehen, wird ein abstufendes Verfahren (z. B. Jonckheere-Terpstra-Test) für fortlaufende Reaktionen empfohlen. Wo die Daten nicht mit einer monotonen Konzentrationsreaktion konsistent sind, sollte ein Dunnett- oder Dunn-Test verwendet werden (ggf. nach einer angemessenen Datentransformation).
55. Für die Fruchtbarkeit werden die Eier täglich gezählt, können aber als Gesamteieranzahl oder als wiederholte Messung analysiert werden. Anlage 10 bietet die Angaben darüber, wie dieser Endpunkt analysiert wird. Für Histopathologiedaten in der Form von Schweregradeinstufungen wird ein neuer statistischer Test, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), entwickelt (33).
56. Endpunkte, die in chemischen Behandlungen beobachtet wurden, die sich signifikant von den angemessenen Kontrollen unterscheiden, sollten gemeldet werden.

Erwägungen zur Datenanalyse

Behandlung von Konzentrationen mit offensichtlich toxischer Wirkung

57. Um festzustellen, ob ein Replikat oder eine Prüfkonzentration insgesamt offensichtlich toxisch wirkt und von der Analyse ausgeschlossen werden muss, sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Eine offensichtliche Toxizität ist bei einer Mortalität von > 4 in einem Replikat zwischen 3 wpf und 9 wpf gegeben, die nicht durch einen technischen Fehler zu erklären ist. Andere Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität sind Hämorrhagie, Verhaltensauffälligkeiten, anomales Schwimmverhalten, Anorexie und sonstige klinische Anzeichen einer Erkrankung. Bei Anzeichen einer subletalen Toxizität können qualitative Untersuchungen erforderlich sein; in diesen Fällen ist grundsätzlich ein Vergleich mit der Kontrollgruppe mit Verdünnungswasser (nur sauberes Wasser) vorzunehmen. Wenn eine offensichtliche Toxizität in den höchsten Behandlungen nachweisbar ist, wird es empfohlen, dass diese Behandlungen nicht in die Analyse aufgenommen werden.

Lösungsmittelkontrollen

58. Die Verwendung eines Lösungsmittels ist nur als letzte Möglichkeit in Betracht zu ziehen, wenn alle sonstigen Verfahren zur Applikation der betreffenden Chemikalie geprüft wurden. Wenn ein Lösungsmittel verwendet wird, ist auch eine Kontrolle mit Verdünnungswasser zu prüfen. Bei Ende des Tests werden die potenziellen Wirkungen des Lösungsmittels bestimmt. Dazu wird ein statistischer Vergleich der Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel und der Kontrollgruppe mit dem Verdünnungswasser vorgenommen. Die wichtigsten Endpunkte für diese Analyse sind Wachstumsdeterminanten (Masse), da diese Parameter auch durch allgemein wirkende Toxizität beeinträchtigt werden können. Wenn statistisch signifikante Unterschiede in diesen Endpunkten zwischen der Verdünnungswasserkontrolle und den Lösungsmittelkontrollgruppen erkannt werden, sollte das beste fachliche Urteilsvermögen angewandt werden, um zu bestimmen, ob die Validität des Tests kompromittiert ist. Wenn die zwei Kontrollen sich unterscheiden, sollten die den Chemikalien ausgesetzten Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasserkontrolle bevorzugt wird. Wenn es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Kontrollgruppen gibt, wird empfohlen, dass die den Prüfchemikalien ausgesetzten Behandlungen mit den gepoolten verglichen werden (Lösungsmittel- und Verdünnungswasserkontrollgruppen), außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasser- oder der Lösungsmittelkontrollgruppe bevorzugt wird.

Prüfbericht

59. Der Prüfbericht sollte Folgendes enthalten:

Prüfchemikalie: physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;

- chemische Kenndaten;

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, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw. (einschließlich des Gehalts an organischem Kohlenstoff, falls zutreffend).

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.

Geprüfte Fischart:

- wissenschaftliche Bezeichnung, ggf. Stamm, Herkunft und Art der Gewinnung der befruchteten Eier sowie anschließende Handhabung.

Prüfbedingungen:

- Fotoperiode(n);
- Testdesign (z. B. Kammergröße, Material- und Wasservolumen, Anzahl an Prüfkammern und Replikaten, Anzahl an Jungtieren pro Replikaten);
- Methode zur Herstellung von Stammlösungen und Häufigkeit der Erneuerung (falls verwendet, sind der Lösungsvermittler und seine Konzentration anzugeben);
- Methode zur Dosierung der Prüfchemikalie (z. B. Pumpen, Verdünnungssysteme);

- Wiederfindungsrate der Methode und nominelle Prüfkonzentrationen, Bestimmungsgrenze, Mittel der gemessenen Werte mit ihren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden, sowie Nachweise dafür, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in echter Lösung beziehen;
- Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff (falls gemessen), Schwebstoffe (falls gemessen), Salzgehalt des Prüfmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;
- die nominalen Prüfkonzentrationen, die Mittelwerte der gemessenen Werte und ihre Standardabweichungen;
- Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße, pH-Wert, Temperatur (täglich) und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;
- ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

Ergebnisse:

- Nachweis, dass die Kontrollen die Gesamtvaliditätskriterien erfüllt haben;
- Daten für die Kontrolle (plus Lösungsmittelkontrolle, falls verwendet) und die Behandlungsgruppen wie folgt, Schlüpfen (Schlupffähigkeit und Zeit bis zum Schlüpfen) für F1 und F2, Überleben nach dem Schlüpfen für F1, Wachstum (Länge und Körpergewicht) für F1, genotypisches Geschlecht und sexuelle Unterscheidung (z. B. sekundäre Geschlechtsmerkmale auf der Grundlage der Afterflossen-Papillen und der gonadalen Histologie) für F1, phänotypisches Geschlecht für F1, sekundäre Geschlechtsmerkmale (Afterflossen-Papillen) für F1 *vtg* mRNA (oder VTG-Protein) für F1, Histopathologiebewertung (Gonaden, Leber und Niere) für F1 und Fortpflanzung (Fruchtbarkeit und Fertilität) für F0, F1; (siehe Tabellen 1 und 2).
- Ansatz der statistischen Analyse (Regressionsanalyse oder Varianzanalyse) und Auswertung der Daten (angewandte statistische Tests oder Modelle);
- NOEC (No Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung;

- LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung (bei $p = 0,05$); EC_x für jede bewertete Wirkung, falls zutreffend, und Konfidenzintervalle (z. B. 90 % oder 95 %) und ein Diagramm des angepassten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde, die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die Formel des Regressionsmodells, die geschätzten Modellparameter und deren Standardfehler.
 - Abweichungen von dieser Prüfmethode und Abweichungen von den Akzeptanzkriterien und Erwägungen der potenziellen Folgen hinsichtlich des Testergebnisses.
60. Für die Ergebnisse der Endpunktmessungen sollten die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (auf Replikat- und Konzentrationsbasis, falls möglich) präsentiert werden.

LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 - (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1–36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925–1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552–2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692–1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-

- Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487–1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288–295.
 - (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Onkogeny. Aquatic Toxicology 77: 78–86.
 - (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamoto M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.
 - (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Verfügbar unter: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
 - (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593–599.
 - (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 - (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.
 - (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
 - (17) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287–1293.
 - (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka:

Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

- (19) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330–338.
- (20) Kapitel C.15 dieses Anhangs, Fisch, Kurzfristige Toxizitätsprüfung an Embryonen und Jungfischen mit Dottersack.
- (21) Kapitel C.37 dieses Anhangs, 21-Tage Fisch-Screening-Assay: Ein Kurzzeittest zur Bestimmung der Östrogenen und Androgenenaktivität und der Aromatasehemmung.
- (22) Kapitel C.41 dieses Anhangs, Fish Sexual Development Test (Test zur Geschlechtsentwicklung bei Fischen).
- (23) Kapitel C.48 dieses Anhangs, Kurzeit-Reproduktionstest an Fischen.
- (24) Kapitel C.47 dieses Anhangs, Toxizitätsprüfung an Fischen im frühen Entwicklungsstadium.
- (25) Kapitel C.49 dieses Anhangs, Prüfung auf akute Toxizität an Fischembryonen (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L und Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M und Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301–308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613–619.

- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108–1116.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fruchtbarkeit = Anzahl der Eier;

Fertilität = Anzahl der lebensfähigen Eier/Fruchtbarkeit;

Gabellänge (FL) ist die Länge von der Spitze des Fischmauls bis zum Ende der mittleren Schwanzflossenstrahlen; wird bei Fischen verwendet, bei denen das Ende der Wirbelsäule schwer zu bestimmen ist (www.fishbase.org)

Schlupfresultat = Schläupflinge/Anzahl an Embryos, die in einen Inkubator kommen

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

Standardlänge (SL) ist die Länge eines Fisches, gemessen von der Spitze des Fischmauls bis zum hinteren Ende des letzten Wirbels oder bis zum hinteren Ende des mittelseitigen Teils des Schwanzansatzes. Einfach ausgedrückt, wird bei diesem Maß die Schwanzflosse nicht mitgemessen. (www.fishbase.org)

Gesamtlänge (TL) ist die Länge von der Spitze des Fischmauls bis zur Spitze des längeren Lappens der Schwanzflosse; wird gewöhnlich entlang der Mittellinie zusammengehaltenen Lappen gemessen. Es wird in gerader Linie gemessen, nicht entlang der Körperkrümmung. (www.fishbase.org)

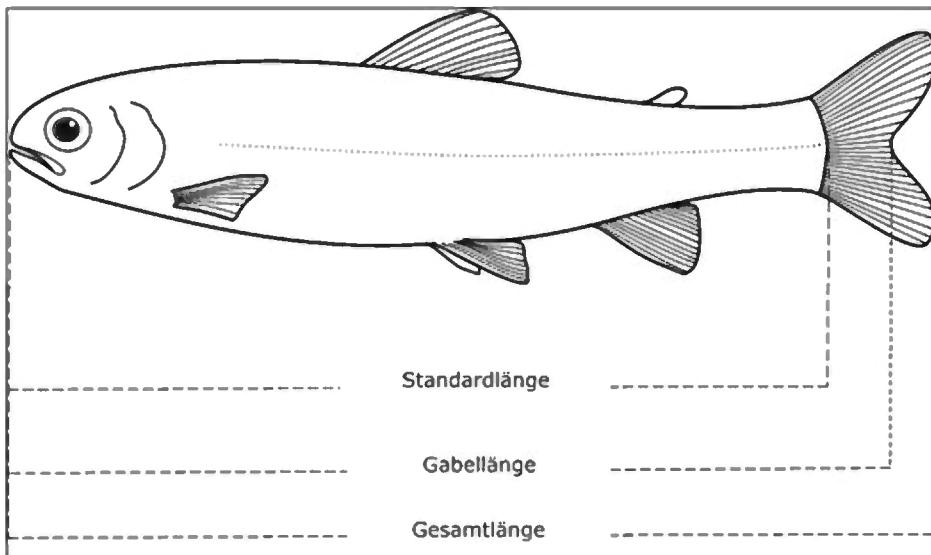


Abbildung 1: Beschreibung der verschiedenen verwendeten Längen

ECx: (Konzentration mit einer Wirkung von x %) Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Prüforganismen zu verzeichnen ist. Eine EC₅₀ beispielsweise ist die Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer eine Wirkung auf einen Endpunkt im Test hat.

Durchflusstest ist ein Test mit durchgehender Strömung der Testlösungen durch das Prüfsystem während der Expositionsdauer.

HPG-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Besatz: Feuchtmasse eines Fischs pro Wasservolumen.

Lowest observed effect concentration (LOEC) die niedrigste geprüfte Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung beobachten lässt (bei $p < 0,05$). Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde. Weitere Hinweise sind den Anlagen 5 und 6 zu entnehmen.

Median Lethal Concentration (LC50): ist die Konzentration einer Prüfchemikalie, die schätzungsweise auf 50 % der Prüforganismen während der Prüfdauer letal wirkt.

No observed effect concentration (NOEC) die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) hat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Besatzdichte: Anzahl Fische je Wasservolumen.

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

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

VTG: Vitellogenin ist ein Phospholipoglycoprotein-Vorläufer für Eidotterprotein, das in der Regel bei geschlechtlich aktiven weiblichen Tieren aller eierlegenden Arten vorkommt.

WPF: Wochen nach der Befruchtung

Anlage 2**CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS**

Stoff	Höchstkonzen- tration
Partikel	5 mg/l
Gesamtgehalt an organischem 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
Kobalt	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

PRÜFBEDINGUNGEN FÜR DEN MEOGRT

- | | |
|---|--|
| 1. Empfohlene Arten | Japanischer Reiskärpfling (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Testtyp | Kontinuierlicher Durchfluss |
| 3. Wassertemperatur | Die nominale Prüftemperatur beträgt 25 °C. Die mittlere Temperatur während des Tests in jedem Becken beträgt 24–26 C. |
| 4. Beleuchtungsqualität | Leuchtstofflampen (breites Spektrum und ~150 Lumen/m ²) (~150 Lux). |
| | 16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit |
| 6. Besatz | F0: 2 adulte Fische/Replikat; F1: eingeleitet mit maximal 20 Eiern (Embryos)/Replikat, reduziert auf 12 Embryos/Replikat beim Schlüpfen, dann 2 adulte Fisch (XX-XY-Brutpaar) bei 9–10 wpf für Fortpflanzungsphase |
| 7. Minimales nutzbares Volumen 1,8 l (z. B., Größe der Prüfkammer: 18 x 9 x 15 cm) der Prüfkammer | |
| 8. Erneuerung der Prüflösungen | Mindestens 5 Volumenerneuerungen/Tag bis zu 16 Volumenerneuerungen/Tag (oder 20 ml/min Durchfluss) |
| 9. Alter der Prüforganismen bei Einleitung | F0: > 12 wpf, aber es wird empfohlen, 16 wpf nicht zu überschreiten |
| 10. Anzahl der Organismen pro Replikat | F0: 2 Fische (Paar aus Männchen und Weibchen); F1: maximal 20 Fische (Eier)/Replikat (erzeugt aus F0- und F1-Brutpaaren). |
| 11. Anzahl der Behandlungen | 5 Prüfchemikalien plus angemessene Kontrolle(n) |
| 12. Anzahl der Replikate pro Behandlung | Mindestens 6 Replikate pro Behandlung für Prüfchemikalien und mindestens 12 Replikate für die Kontrolle und für die Lösungsmittelkontrolle, falls diese verwendet wird (die Anzahl an Replikaten wird in der Fortpflanzungsphase in F1 verdoppelt) |
| 13. Anzahl der Organismen pro | Mindestens 84 Fische in F0 und 504 in F1. (Wenn eine Lösungsmittelkontrolle verwendet wird, dann 108 Fische in F0 und 648 |

Test	Fische in F1). Die gezählte Einheit ist der Embryo nach Eleuthero.
14. Fütterungsregime	Die Fische werden mit Salinenkrebsen, <i>Artemia</i> spp., (24 Stunden alte nauplii) ad libitum gefüttert, ggf. ergänzt mit einem im Handel erhältlichen Flockenfutter (Ein Beispiel für einen Fütterungsplan, der ein angemessenes Wachstum und die Entwicklung gewährleistet, um die solide Reproduktion zu unterstützen, findet sich in Anlage 6).
15. Belüftung	Keine, außer der gelöste Sauerstoff nähert sich < 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts
16. Verdünnungswasser	Sauberer Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser.
17. Expositionsdauer	Primär 19 Wochen (von F0 bis F2 Schlüpfen)
18. Biologische Endpunkte (primär)	Schlupffähigkeit (F1 und F2); Überleben (F1, vom Schlüpfen bis 4 wpf (Ende des Larven-/Beginn des Jungtierstadiums), von 4 bis 9 (oder 10) wpf (Beginn des Jungtier- bis subadulten Stadiums) und von 9 bis 15 wpf (subadultes Stadium bis adulte Tötung)); Wachstum (F1, Länge und Gewicht bei 9 und 15 wpf); sekundäre Geschlechtsmerkmale (F1, Afterflossen-Papillen bei 9 und 15 wpf); Vitellogenin (F1, <i>vtg</i> mRNA oder VTG-Protein bei 15wpf); phänotypisches Geschlecht (F1, über Gonadenhistologie bei 15 wpf); Reproduktion (F0 und F1, Fruchtbarkeit und Fertilität für 21 Tage); Zeit bis zum Laichen (F1); und Histopathologie (F1, Gonaden, Leber und Niere bei 15 wpf)
19. Testvaliditätskriterien	Gelöster Sauerstoff von ≥ 60 % Luftsauerstoff-Sättigungswert; mittlere Wassertemperatur von 24–26 C während des gesamten Tests; erfolgreiche Reproduktion von ≥ 65 % der Weibchen bei den Kontrollen; tägliche mittlere Befruchtung von ≥ 20 Eiern bei den Kontrollen; Schlupffähigkeit von ≥ 80 % (Durchschnitt) bei den Kontrollen (jeweils in F1 und F2); Überleben nach dem Schlüpfen bis 3 wpf von ≥ 80 % (Durchschnitt) und von 3 wpf bis zur Tötung für die Generation von ≥ 90 % (Durchschnitt) bei den Kontrollen (F1), Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung sollten zufriedenstellend innerhalb von ± 20 % der mittleren gemessenen Werte beibehalten werden.

Anlage 4

LEITLINIEN ZU TYPISCHEN KONTROLLWERTEN

Es sollte angemerkt werden, dass diese Kontrollwerte auf einer begrenzten Anzahl von Validierungsstudien basieren und Änderungen im Falle von weiteren Erkenntnissen unterliegen.

Wachstum

Die Messungen von Gewicht und Länge werden für alle Fische, von denen eine Probe genommen wird, bei 9 (oder 10) und 15 Wochen nach der Befruchtung (wpf) vorgenommen. Die Befolgung dieses Protokolls ergibt die erwarteten Nassgewichte bei 9 wpf von 85–145 mg für Männchen und 95–150 mg für Weibchen. Die erwarteten Gewichtswerte bei 15 wpf betragen 250–330 mg für Männchen und 280–350 mg für Weibchen. Während es bei einzelnen Fischen bedeutende Abweichungen von diesen Bereichen geben kann, würden mittlere Gewichtswerte bei Kontrollen, die erheblich außerhalb dieser Bereiche liegen (und insbesondere geringer sind), auf Probleme mit der Fütterung, der Temperaturkontrolle, der Wasserqualität, eine Erkrankung oder eine Kombination dieser Faktoren hindeuten.

Schlüpfen

Der Schlupferfolg liegt bei den Kontrollen normalerweise um die 90 %, Werte von nur 80 % kommen jedoch häufiger vor. Ein Schlupferfolg von weniger als 75 % kann auf eine unzureichende Anregung der sich entwickelnden Eier oder nicht genug Sorgfalt beim Umgang mit den Eiern hindeuten, wie beispielsweise mangelndes pünktliches Entfernen von toten Eiern, was zu einem Pilzbefall führen kann.

Überleben

Überlebensraten bis 3 wpf ab dem Schlüpfen und nach 3 wpf betragen normalerweise 90 % oder mehr bei Kontrollen, aber Überlebensraten in frühen Lebensstadien von nur 80 % sind nicht alarmierend. Überlebensraten bei Kontrollen von weniger als 80 % wären Grund zur Sorge und könnten eine unzureichende Reinigung der Aquarien anzeigen, was zu einem Verlust der larvalen Fische aufgrund von Erkrankungen oder Erstickung durch zu niedrige

gelösten Sauerstoffpegel führt. Auch Mortalität kann infolge einer Verletzung bei der Beckenreinigung und durch den Verlust larvaler Fische im Abflusssystem des Beckens auftreten.

Vitellogenin-Gen

Während absolute Niveaus des *Vitellogenin*-Gens (*vtg*), ausgedrückt als Kopien/ng der Gesamt-mRNA, sich aufgrund der verwendeten Verfahren oder Instrumente zwischen den Laboren stark unterscheiden könnten, sollte das Verhältnis von *vtg* bei Kontrollweibchen im Vergleich zu Kontrollmännchen ungefähr 200 Mal höher sein. Es ist nicht ungewöhnlich, dass dieses Verhältnis bei einem so hohen Wert wie 1000 oder 2000 liegt, jedoch wäre ein Verhältnis von weniger als 200 verdächtig und könnte auf Probleme mit einer Probenverunreinigung oder Problemen mit dem verwendeten Verfahren und/oder den Reagenzien hinweisen.

Sekundäre Geschlechtsmerkmale

Bei Männchen liegt der normale Bereich der sekundären Geschlechtsmerkmale, der als die Gesamtanzahl der Segmente in den Flossenstacheln der Afterflossen-Papille definiert ist, bei 40–80 Segmenten bei 9–10 wpf. Bei 15 wpf sollte der Bereich für Kontrollmännchen ungefähr 80–120 und 0 für Kontrollweibchen betragen. Aus unerklärten Gründen liegt in seltenen Fällen bei Männchen bis 9 wpf keine Papille vor, aber da alle Kontrollmännchen bis 15 wpf eine Papille entwickelt haben, wird dies höchstwahrscheinlich durch eine verzögerte Entwicklung hervorgerufen. Das Vorhandensein einer Papille bei Kontrollweibchen weist auf das Vorhandensein von XX-Männchen in der Population hin.

XX-Männchen

Das normale Auftreten von XX-Männchen im Hintergrund scheint in der Kultur ungefähr 4 % oder weniger bei 25 °C zu betragen, wobei das Vorkommen sich mit gesteigerter Temperatur erhöht. Es sollten Schritte unternommen werden, um den Anteil von XX-Männchen in der Population zu minimieren. Da das Vorhandensein von XX-Männchen eine genetische Komponente zu haben scheint und deshalb vererblich ist, ist die Überwachung des Kulturstamms und die Gewährleistung, dass XX-Männchen nicht verwendet werden, um den Kulturstamm zu propagieren, ein effektives Mittel zur Reduzierung des Vorkommens von XX-Männchen in der Population.

Laichaktivität

Die Laichaktivität bei den Kontrollreplikaten sollte vor dem Durchführen der Fruchtbarkeitsbeurteilung täglich überwacht werden. Die Kontrollpaare können qualitativ anhand einer Sichtprüfung auf Nachweise für eine Laichaktivität bewertet werden. Bis 12–14 wpf sollten die meisten Kontrollpaare laichen. Eine geringe Anzahl an Laichpaaren zu dieser Zeit weist auf potenzielle Probleme mit der Gesundheit, der Reife oder dem Wohlbefinden des Fisches hin.

Fruchtbarkeit

Gesunde und gut gefütterte Reiskärpfplinge laichen 12–14 wpf allgemein täglich und produzieren zwischen 15 und 50 Eiern pro Tag. Die Eierproduktion für 16 der empfohlenen 24 Kontrollbrutpaare (> 65 %) sollte bei mehr als 20 Eier pro Paar pro Tag liegen und sogar bis zu 40 Eier pro Tag erreichen. Eine geringere Menge kann auf unreife, mangelernährte oder ungesunde Laichpaare hindeuten.

Fertilität

Der Prozentsatz an befruchteten Eiern für Kontroll-Laichpaare liegt normalerweise im Bereich von 90 %, wobei Werte in den mittleren bis oberen 90ern nicht ungewöhnlich sind. Fertilitätsraten von weniger als 80 % für Kontrolleier sind verdächtig und können entweder auf ungesunde Tiere oder nicht ideale Kulturbedingungen schließen lassen.

Anlage 5

BEISPIEL EINES FÜTTERUNGSPLANS

Ein Beispiel eines Fütterungsplans zur Gewährleistung eines ausreichenden Wachstums und einer adäquaten Entwicklung zur Unterstützung der soliden Reproduktion wird in Tabelle 1 dargestellt. Abweichungen von diesem Fütterungsplan können annehmbar sein, aber es wird empfohlen, dass sie geprüft werden, um zu verifizieren, dass das annehmbare Wachstum und die Reproduktion beachtet werden. Um den vorgeschlagenen Fütterungsplan einzuhalten, muss das Trockengewicht der Salinenkrebse pro Volumen an Salinenkrebsschlamm vor Beginn des Tests bestimmt werden. Dies kann durch das Wiegen eines definierten Volumens an Salinenkrebsschlamm erfolgen, der 24 Stunden lange bei 60 °C auf vorgewogenen Schalen getrocknet wurde. Um das Gewicht der Salze im Schlamm zu berücksichtigen, sollte eine gleiche Menge derselben Salzlösung, die im Schlamm verwendet wurde, ebenfalls getrocknet, gewogen und vom Gewicht des getrockneten Salinenkrebsschlamm abgezogen werden. Alternativ können die Salinenkrebse gefiltert und vor dem Trocknen mit destilliertem Wasser abgespült werden, um so das Erfordernis zu beseitigen, das Gewicht von „Leersalz“ zu messen. Diese Informationen werden genutzt, um die Informationen in der Tabelle bezüglich des Trockengewichts der Salinenkrebse in das Volumen des pro Fisch zu fütternden Salinenkrebsschlamm umzuwandeln. Zusätzlich dazu wird empfohlen, dass die Aliquoten des Salinenkrebsschlamm wöchentlich gewogen werden, um das korrekte Trockengewicht der verfütterten Salinenkrebse zu bestätigen.

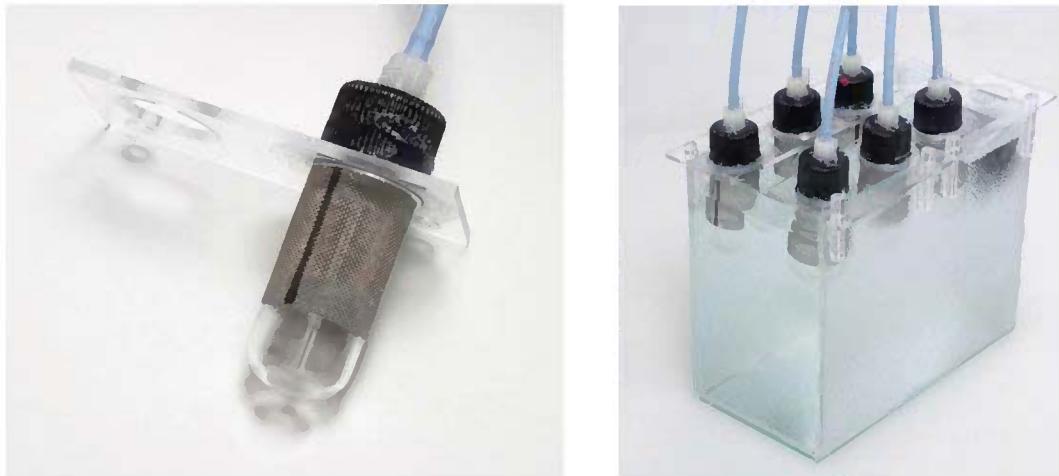
Tabelle 1: Beispiel eines Fütterungsplans

Zeit (nach dem Schlüpfen)	Salinenkrebs (mg Trockenmasse/Fisch/Tag)
Tag 1	0,5
Tag 2	0,5
Tag 3	0,6
Tag 4	0,7
Tag 5	0,8
Tag 6	1,0
Tag 7	1,3
Tag 8	1,7
Tag 9	2,2
Tag 10	2,8
Tag 11	3,5
Tag 12	4,2
Tag 13	4,5
Tag 14	4,8
Tag 15	5,2
Tag 16-21	5,6
Woche 4	7,7
Woche 5	9,0
Woche 6	11,0
Woche 7	13,5
Woche 8-Tötung	22,5

Anlage 6

BEISPIELE EINER EIERINKUBATIONSKAMMER

Beispiel A



Dieser Inkubator besteht aus einem Zentrifugenröhrrchen aus durchtrenntem Glas, der über eine Edelstahlhülse verbunden ist und durch die obere Kappe der Zentrifugenschraube in seiner Position gehalten wird. Ein kleines Glas- oder Edelstahlröhrrchen wird durch die Kappe projiziert und nahe des abgerundeten Bodens positioniert und es werden vorsichtig Luftblasen erzeugt, um die Eier schwebend zu halten und die Übertragung von saprophytischen Pilzinfektionen zwischen den Eiern zu reduzieren, während der chemische Austausch zwischen dem Inkubator und dem Haltebecken vereinfacht wird.

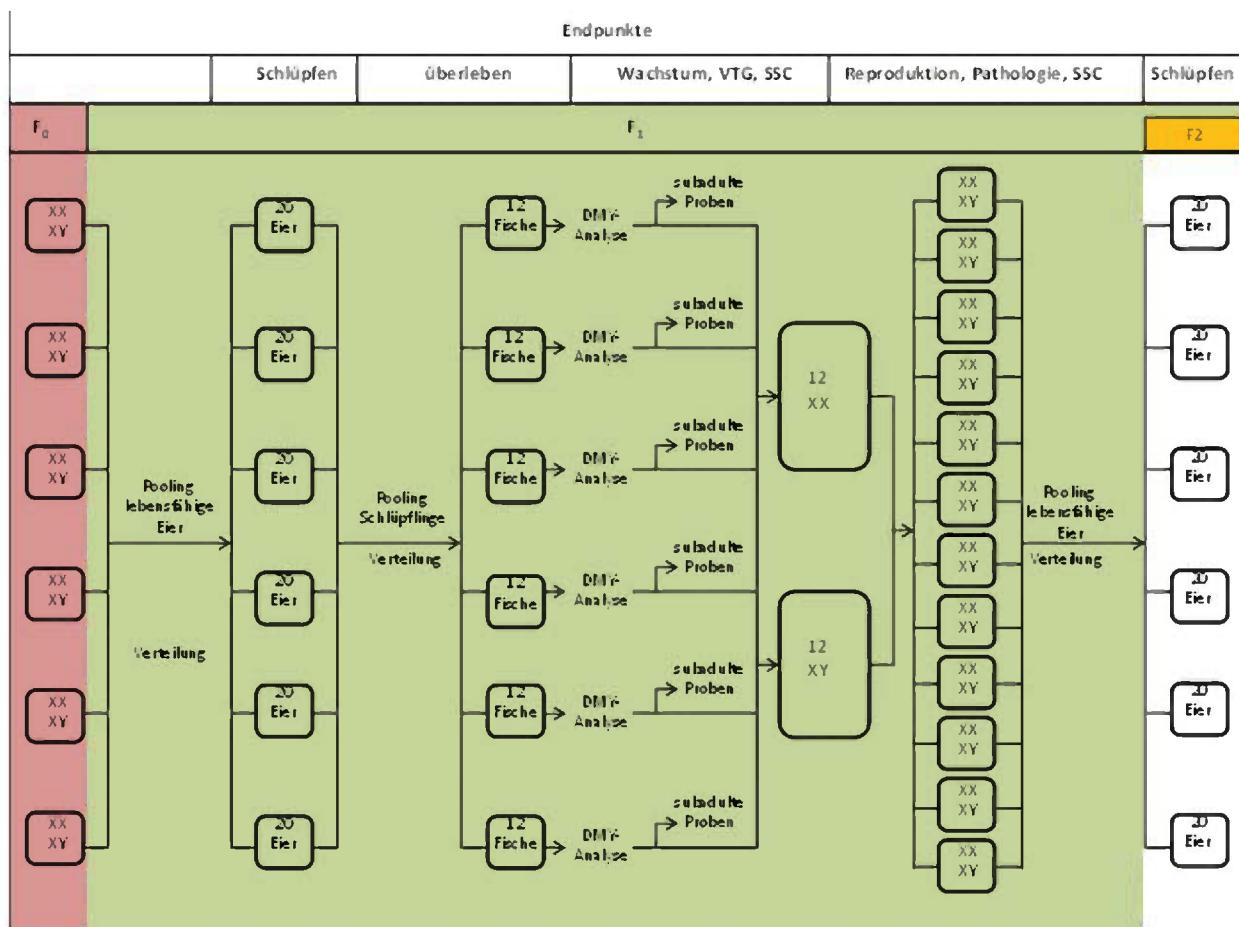
Beispiel B



Der Inkubator besteht aus einem Glaszyllinderkörper (5 cm Durchmesser und 10 cm Höhe) und Edelstahldrahtgeflecht (0,25 φ und 32 Maschenweite), das mithilfe eines PTFE-Rings an der Unterseite des Körpers befestigt ist. Die Inkubatoren für Eier von Reiskärpflingen werden von den Hebestangen in die Becken gehängt und vertikal (ungefähr 5 cm Amplitude) in einem ungefähren Kreis (ca. einmal alle 4 Sekunden) geschüttelt.

Anlage 7**SCHEMATISCHE DARSTELLUNG FÜR DAS POOLING UND BESIEDELN VON REPLIKATEN WÄHREND DER MEOGRT-PRÜFMETHODE**

Abb. 1: Pooling und Besiedelung von Replikaten während des MEOGRT. Die Abbildung stellt eine Behandlung oder $\frac{1}{2}$ Kontrolle dar. Aufgrund des Pooling ist die Replikatsidentität während des Tests nicht durchgehend. Bitte beachten, dass der Begriff „Eier“ sich auf lebensfähige, befruchtete Eier bezieht (ähnlich zu Embryos).



Behandlungen und Replikation.

Die Prüfmethode empfiehlt Behandlungen mit fünf Prüfchemikalien mithilfe von technischem Material und einer Negativkontrolle. Die Anzahl der Replikate pro Behandlung bleibt während des MEOGRT nicht konstant und die Anzahl der Replikate in der Kontrollbehandlung ist doppelt so hoch wie bei einer Behandlung mit einer einzelnen Prüfchemikalie. In F0 verfügt jede Behandlung mit Prüfchemikalien über sechs Replikate, während es bei der Negativkontrollbehandlung 12 Replikate sind. Von Lösungsmitteln wird stark abgeraten, und falls sie verwendet werden, sollte eine Begründung für die Verwendung eines Lösungsmittels und die Wahl des Lösungsmittels im MEOGRT-Bericht aufgenommen werden. Wenn eine Lösungsmittel verwendet wird, sind außerdem zwei Arten von Kontrollen erforderlich: a) eine Lösungsmittelkontrolle und b) eine Negativkontrolle. Diese zwei Kontrollgruppen sollten an allen Punkten der MEOGRT-Zeitleiste jeweils aus einer vollen Zahl an Replikaten bestehen. Während der Entwicklung der Prüforganismen in der F1-Generation (und F2 bis zum Schlüpfen), bleibt diese Replikatstruktur gleich. Im adulten Stadium wird die Anzahl der Brutpaarreplikate pro Behandlung optimalerweise jedoch verdoppelt, wenn die F1-Brutpaare aufgestellt werden; deshalb gibt es bei jeder Behandlung mit Prüfchemikalien bis zu 12 Replikatpaare und in der Kontrollgruppe 24 Replikatpaare (und ggf. weitere 24 Replikatpaare in der Lösungsmittelkontrolle). Die Bestimmung des Schlüpfens von Embryos, die von den F1-Paaren abgelaicht wurden, erfolgt über dieselbe Replikatstruktur, die für die Embryos verwendet wurde, die von den F0-Paaren abgelaicht wurden, was ursprünglich sechs Replikate pro Behandlung mit Prüfchemikalien und 12 Replikate in die Kontrollgruppe(n) bedeutet.

Anlage 8

ZÄHLEN VON AFTERFLOSSEN-PAPILLEN

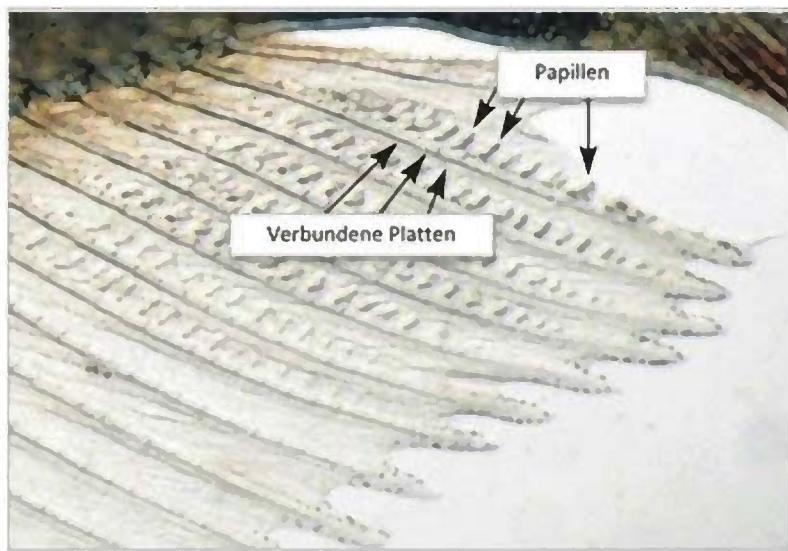
Wichtiges Material und Reagenzien

- Stereomikroskop (optional mit angebrachter Kamera)
- Fixierlösung (z. B. Davidson (Bouin wird nicht empfohlen)), wenn nicht auf einem Bild gezählt wird

Verfahren

Nach der Nekropsie sollte ein Bild der Afterflosse aufgenommen werden, um ein bequemes Zählen der Afterflossen-Papillen zu ermöglichen. Während die Bildgebung die empfohlene Methode ist, kann die Afterflosse mit der Davidson-Fixierlösung oder anderen angemessenen Fixierlösungen ca. 1 Minute lang befestigt werden. Es ist wichtig, die Afterflosse während der Fixierung flach zu halten, um das Zählen der Papillen einfacher zu gestalten. Die Karkasse mit der Afterflosse kann im Davidson-Fixierlösung oder einer anderen angemessenen Fixierlösung aufbewahrt werden, bis sie analysiert wird. Es muss die Anzahl der verbundenen Platten (siehe **Abbildung 1**) mit Papillen gezählt werden, die aus dem Hinterrand der verbundenen Platte hervorstehen.

Abb. 1: Afterflossen-Papille



Anlage 9

DETAILLIERTE ZEITLEISTE DES MEOGRT

Prüfwochen 1–3 (F0)

Die laichenden Fische der F0-Generation, die die Auswahlkriterien erfüllt haben (siehe Abschn. 16–20) werden drei Wochen lang exponiert, um es den sich entwickelnden Gameten und Gonadengeweben zu ermöglichen, der Prüfchemikalie ausgesetzt zu sein. In jedem Replikatbecken befindet sich ein einziges Fischpaar (Brutpaar aus XX-Weibchen und XY-Männchen). Die abgelaichten Eier werden 21 Tage lang ab Testtag 1 gesammelt, gezählt und hinsichtlich ihrer Fertilität beurteilt.

Prüfwoche 4 (F0 und F1)

Die befruchteten und lebensfähigen Eier (Embryos) sollten bevorzugt an einem einzigen Tag gesammelt werden; wenn es jedoch nicht genug Embryos gibt, können diese über zwei Tage hinweg gesammelt werden. In diesem Fall werden alle Embryos, die am ersten Tag gesammelt wurden, für die Behandlungen mit denen, die am zweiten Tag gesammelt wurden, zusammengelegt. Dann werden die insgesamt gepoolten Embryos für jede Behandlung nach dem Zufallsprinzip auf jeden der Replikatinkubatoren mit 20 Embryos pro Inkubator verteilt. Die Mortalitäten der befruchteten Eier (Embryos) werden täglich kontrolliert und aufgezeichnet. Tote Eier werden aus den Inkubatoren entfernt (tote befruchtete Eier können insbesondere in den frühen Stadien durch einen deutlich erkennbaren Verlust an Lichtdurchlässigkeit und eine Veränderung der Färbung bezeichnet werden, hervorgerufen durch Gerinnung und/oder Ausfällung von Eiweiß, was zu einem weiß-opaken Aussehen führt; OECD 210).

Hinweis: Wenn eine einzelne Behandlung einen zweiten Sammeltag erfordert, müssen alle Behandlungen (einschließlich der Kontrollen) dieses Verfahren befolgen. Wenn es nach dem zweiten Tag des Sammelns nicht genügend Embryos in einer Behandlung gibt, um 20 Embryos pro Inkubator zu erhalten, muss die Anzahl der Embryos bei dieser spezifischen Behandlung auf 15 Embryos pro Inkubator reduziert werden. Wenn es nicht genug Embryos gibt, um 15 pro Inkubator zu haben, dann muss die Anzahl der Replikatinkubatoren reduziert werden, bis genug Embryos für 15 pro Inkubator vorhanden sind. Zusätzlich dazu könnten mehr Brutpaare pro Behandlung und Kontrollen in F0 hinzugefügt werden, um

mehr Eier zu produzieren, um die empfohlenen 20 pro Replikat zu erhalten.

Am Testtag 24 werden die F0-Brutpaare schmerzfrei getötet und Gewicht und Länge aufgezeichnet. Wenn erforderlich können die F0-Brutpaare weitere 1–2 Tage behalten werden, um F1 neu zu starten.

Prüfwochen 5–6 (F1)

Ein bis zwei Tage vor dem geplanten Start des Schlüpfens muss die Anregung der inkubierten Eier gestoppt oder reduziert werden, um das Schlüpfen zu beschleunigen. Da an jedem Tag Embryos schlüpfen, werden die Jungtiere nach Behandlung zusammengefasst und systematisch auf jedes larvale Replikatbecken in einer spezifischen Behandlung mit nicht mehr als 12 Jungtieren verteilt. Dies geschieht durch zufällige Auswahl von Jungtieren und Platzierung eines einzelnen Jungtiers in aufeinanderfolgenden Replikaten in einer wahllosen Ziehung, wobei die Reihenfolge der spezifischen Behandlungsreplikate durchlaufen wird, bis alle Replikate innerhalb Behandlung über 12 Jungtiere verfügen. Wenn es nicht genug Jungtiere gibt, um alle Replikate zu füllen, dann muss sichergestellt werden, dass so viele Replikate wie möglich über 12 Jungtiere verfügen, um die F1-Phase zu starten.

Die Eier, die bis zum Doppelten des mittleren Kontrolltags für das Schlüpfen noch nicht geschlüpft sind, werden als nicht lebensfähig angesehen und entsorgt. Die Anzahl an Jungtieren wird aufgezeichnet und der Schlupferfolg (Schlupffähigkeit) wird in jedem Replikat berechnet.

Prüfwochen 7–11 (F1)

Das Überleben der larvalen Fische wird geprüft und täglich in allen Replikaten aufgezeichnet. Am Prüftag 43 wird die Anzahl der überlebenden Fisch in jedem Replikat sowie die ursprüngliche Anzahl der Jungtiere im Replikat aufgezeichnet (nominal zwölf). Dies ermöglicht die Berechnung des Überlebens vom Schlüpfen bis zum subadulten Stadium.

Prüfwochen (F1)

An den Prüftagen 78–85 wird eine kleine Probe aus der Schwanzflosse jedes Fischs entnommen, um das genotypische Geschlecht jedes einzelnen Tiers zu bestimmen (d. h. Flossenabtrennung). Diese Information wird verwendet, um Brutpaare zu bilden.

Innerhalb von drei Tagen nach der Bestimmung des genotypischen Geschlechts jedes Fischs werden zufällig 12 Brutpaare pro Behandlung und 24 Paare pro Kontrolle gebildet. Zwei XX- und XY-Fische aus jedem Replikat werden zufällig ausgewählt und dann nach Geschlecht gepoolt. Anschließend werden sie zufällig ausgewählt, um ein Brutpaar zu bilden (d. h. XX-XY-Paar). Es werden mindestens 12 Replikate pro Chemikalienbehandlung und mindestens 24 Replikate für die Kontrolle mit jeweils einem Brutpaar pro Replikat gebildet. Wenn ein Replikat nicht entweder zwei XX- oder zwei XY-Fische für das Pooling zur Verfügung hat, dann sollten Fische mit dem angemessenen Geschlechtsgenotyp aus anderen Replikaten innerhalb der Behandlung genommen werden.

Die verbleibenden Fische (maximal 8 Fische pro Replikat) werden schmerzfrei getötet und von ihnen wird eine Probe für die verschiedenen subadulten Endpunkte genommen. Die *dmy*-Daten (XX oder XY) für alle subadulten Proben werden behalten, um sicherzustellen, dass alle Endpunktdata auf das genetische Geschlecht jedes einzelnen Fischs bezogen werden können.

Prüwochen 13–14 (F1)

Die Exposition wird fortgesetzt, während sich die subadulten Brutpaare in adulte Fische weiterentwickeln. Am Prüftag 98 (d. h. dem Tag, bevor das Sammeln der Eier beginnt), werden die Eier aus den Aquarien und von den Weibchen entfernt.

Prüwochen 15–17 (F1)

Die abgelaichten Eier werden 21 nachfolgende Tage lang in jedem Replikat gesammelt und auf Fruchtbarkeit und Fertilität bewertet.

Prüwoche 18 (Wiederholung von Prüwoche 4) (F1 und F2)

Am Prüftag 120 erfolgt die Eiersammlung in jedem Replikatbecken morgens. Die gesammelten Eier werden bewertet und die befruchteten Eier (Fasern entfernt) von jedem der Brutpaare nach Behandlung gepoolt und systematisch auf Eierinkubationskammern mit 20 befruchteten Eiern pro Inkubator verteilt. Die Inkubatoren können in separaten „Inkubatorbecken“, die für jede Behandlung eingerichtet wurden, oder im Replikatbecken platziert werden, die beim Schlüpfen die geschlüpften Larven enthalten. Es wird bevorzugt, dass die Embryos an einem einzigen Tag gesammelt werden; wenn es jedoch nicht genug Embryos gibt, können die Embryos über zwei Tage hinweg gesammelt werden. Wenn über zwei Tage gesammelt wird, werden alle Embryos in der Behandlung, die am ersten Tag gesammelt wurden, mit denen gepoolt, die am zweiten Tag gesammelt wurden. Dann werden die insgesamt gepoolten Embryos für jede Behandlung nach dem Zufallsprinzip auf

jeden der Replikatinkubatoren mit 20 Embryos pro Inkubator verteilt. Hinweis: Wenn eine einzelne Behandlung einen zweiten Sammeltag erfordert, müssen alle Behandlungen (einschließlich der Kontrollen) dieses Verfahren befolgen. Wenn es nach dem zweiten Tag des Sammelns eine unzureichende Anzahl von Embryos in einer Behandlung gibt, um 20 Embryos pro Inkubator zu erhalten, muss die Anzahl der Embryos in dieser spezifischen Behandlung auf 15 Embryos pro Inkubator reduziert werden. Wenn es nicht genug Embryos gibt, um 15 pro Inkubator zu haben, muss die Anzahl der Replikatinkubatoren reduziert werden, bis genug Embryos für 15 pro Inkubator vorhanden sind.

Am Prüftag 121 (oder Prüftag 122, um sicherzustellen, dass F2 gut gestartet ist) werden die F1-Brutpaare schmerzfrei getötet und für die adulten Endpunkte analysiert. Wenn erforderlich können die F1-Brutpaare weitere 1–2 Tage behalten werden, um F2 neu zu starten.

Prüfwochen 19–20 (F2)

Ein bis zwei Tage vor dem geplanten Start des Schlüpfens muss die Anregung der inkubierten Eier gestoppt oder reduziert werden, um das Schlüpfen zu beschleunigen. Wenn der Test durch den Abschluss des Schlüpfens von F2 beendet wird, werden die Jungtiere jeden Tag gezählt und entsorgt. (Embryos, die nach einer längeren Inkubationszeit, die als zwei Mal der mediane Kontrolltag des Schlüpfens definiert ist, noch nicht geschlüpft sind, werden als nicht lebensfähig angesehen).

Anlage 10

STATISTISCHE ANALYSE

Die Arten von biologischen Daten, die im MEOGRT erzeugt werden, sind nicht einzigartig, und mit Ausnahme von pathologischen Daten wurden viele geeignete statistische Methoden entwickelt, um ähnliche Daten in Abhängigkeit von den Merkmalen der Daten wie Normalität, Varianzhomogenität, ob das Studiendesign für Hypothesentests oder Regressionsanalysen, parametrische oder nicht-parametrische Tests usw. geeignet ist, ordnungsgemäß zu analysieren. Im Allgemeinen folgen die vorgeschlagenen statistischen Analysen den Empfehlungen der OECD für Ökotoxizitätsdaten (OECD 2006) und ein Entscheidungsflussdiagramm für die MEOGRT-Datenanalyse ist in Abbildung 2 zu sehen.

Es wird angenommen, dass die Datensätze meist monotone Reaktionen anzeigen. Zusätzlich dazu sollte das Problem, einen einseitigen statistischen Test im Vergleich zu einem zweiseitigen statistischen Test zu verwenden, berücksichtigt werden. Wenn es keine biologische Begründung gibt, die einen einseitigen Test angemessen machen würde, wird empfohlen, einen einseitigen Test zu verwenden. Während der folgende Abschnitt bestimmte statistische Tests empfiehlt, würden, wenn angemessene und/oder aussagekräftige statistische Methoden zur Anwendung der spezifischen, im MEOGRT erzeugten Daten entwickelt werden, diese statistischen Tests verwendet werden, um diese Vorteile auszunutzen.

Die MEOGRT-Daten sollten für jedes genotypische Geschlecht separat analysiert werden. Es gibt zwei Strategien, um die Daten von Fischen mit umgekehrtem Geschlecht zu analysieren (entweder XX-Männchen oder XY-Weibchen). 1) Alle Daten von Fischen mit umgekehrtem Geschlecht für den gesamten Test zensieren, außer der Prävalenz des umgekehrten Geschlechts in jedem Replikat. 2) Die Daten aller Fische mit umgekehrtem Geschlecht im Datensatz lassen und auf Basis des Genotyps analysieren.

Histopathologische Daten

Die histopathologischen Daten werden als Einstufungen des Schweregrads eingetragen, die mit einem neu entwickelten statistischen Verfahren, dem Rao-Scott Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), bewertet werden (Green et al., 2014). Die *Rao-Scott-*

Anpassung speichert Informationen zur Testreplikation; das Verfahren *by Slices* integriert die biologische Erwartung, dass die Einstufungen des Schweregrads dazu tendieren, sich mit steigenden Behandlungskonzentrationen zu erhöhen. Bei jeder Diagnose spezifiziert der RSCABS-Ausgang, welche Behandlungen eine höhere Prävalenz der Pathologie besitzen als Kontrollen und die zugehörigen Sicherheitsstufen.

Fruchtbarkeitsdaten

Analysen für Vermehrungsratendaten bestehen aus einem abstufenden Jonckheere-Terpstra- oder Williams-Test, um die Behandlungseffekte zu bestimmen, sofern die Daten mit einer monotonen Konzentrationsreaktion konsistent sind. Bei einem abstufenden Test erfolgen alle Vergleiche auf einem Signifikanzniveau von 0,05 und es werden keine Anpassungen für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche gemacht. Es wird erwartet, dass die Daten mit einer monotonen Konzentrationsreaktion konsistent sind, aber dies kann entweder durch Sichtprüfung der Daten oder durch die Konstruktion von linearen und quadratischen Kontrasten von Behandlungsmittelwerten nach einer Transformation nach Reihenfolge der Daten verifiziert werden. Sofern der quadratische Kontrast signifikant ist und der lineare Kontrast nicht signifikant ist, wird die Trendprüfung durchgeführt. Andernfalls wird der Dunnett-Test verwendet, um die Behandlungseffekte zu bestimmen, wenn die Daten normal verteilt sind und homogene (ähnliche) Varianzen aufweisen. Sind diese Anforderungen nicht erfüllt, wird der Dunn-Test mit einer Bonferroni-Holm-Anpassung verwendet. Alle indizierten Tests werden unabhängig von allgemeinen F- oder Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Weitere Angaben werden in OECD 2006 bereitgestellt.

Es können alternative Methoden verwendet werden, wie beispielsweise ein verallgemeinertes lineares Modell mit Poisson-Fehlern für Eierzählungen (ohne Transformation), wenn dies statistisch begründet wird (Cameron und Trivedi, 2013). Statistische Beratung wird empfohlen, wenn ein alternativer Ansatz verwendet wird.

Tägliche Eierzählung in einer einzelnen Generation

Das ANOVA-Modell ist gegeben durch $Y = \text{Zeit} * \text{Zeit} + \text{Behandlung} + * \text{Behandlung} + \text{Zeit} * \text{Behandlung} + * \text{Zeit} * \text{Behandlung}$, mit zufälligen Effekten von Replikat(Generation*Behandlung) und Zeit*Replikat(Behandlung), was ungleichmäßige Varianzkomponenten beider Arten über Generationen hinweg ermöglicht. „Zeit“ bezieht sich hier auf die Häufigkeit der Eierzählungen (z. B. Tag oder Woche). Dies ist eine Analyse mit Messwiederholungen, wobei die Korrelationen zwischen Beobachtungen in denselben Replikaten die Datenart mit wiederholten Messungen erklärt.

Die Haupteffekte der Behandlung werden mit dem Dunnett- (oder Dunnett-Hsu-)Test geprüft, der an die Anzahl der Vergleiche angepasst wird. Anpassungen für den Haupteffekt der Generation oder Zeit sind erforderlich, da es für diese zwei Faktoren kein „Kontrollniveau“ gibt und jedes Stufenpaar ein Vergleich möglicher Interessen ist. Wenn der F-Test für den Haupteffekt auf Niveau 0,05 signifikant ist, dann können die paarweisen Vergleiche für diese zwei Haupteffekte über die Niveaus dieses Faktors hinweg ohne weitere Anpassungen auf dem Niveau von 0,05 geprüft werden.

Das Modell umfasst Zwei- und Drei-Faktor-Interaktion, sodass ein Haupteffekt für beispielsweise die Zeit eventuell nicht signifikant ist, obwohl die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hat. Wenn deshalb eine Zwei- oder Drei-Faktor-Interaktionen im Hinblick auf die Zeit bei einem Niveau von 0,05 signifikant ist, dann können die Niveauvergleiche der Zeit auf dem 0,05-Signifikanzniveau ohne weitere Anpassung übernommen werden.

Danach folgen F-Tests für die Signifikanz der Behandlung innerhalb der Zeit, die sogenannten „Scheiben“ in der ANOVA-Tabelle. Wenn die Scheibe für die Behandlung beispielsweise innerhalb von F1 und Zeit 12 liegt und auf einem Niveau von 0,05 signifikant ist, dann können die paarweisen Vergleiche für die Behandlung innerhalb von F1 und Zeit 12 ohne weitere Anpassung auf dem Niveau von 0,05 akzeptiert werden. Ähnliche Aussagen gelten für Tests auf Zeit innerhalb von F1 und Behandlung und für Generation innerhalb einer Zeit und Behandlung.

Schließlich sollten für Vergleiche, die nicht unter eine der obigen Kategorien fallen, Vergleiche mithilfe der Bonferroni-Holm-Anpassung an p-Werte angepasst werden. Weitere Informationen zu Analysen solcher Modelle können in Hocking (1985) und Hochberg und Tamhane (1987) gefunden werden.

Alternativ werden die Rohdaten aufgezeichnet und im Studienbericht als die Vermehrungsrate (Anzahl an Eiern) pro Replikat für jeden Tag präsentiert. Der Replikatmittelwert der Rohdaten sollte berechnet werden und dann eine Quadratwurzeltransformation angewandt werden. Eine Einweg-ANOVA auf dem transformierten Replikatmittelwert sollte berechnet werden, gefolgt von Dunnett-Kontrasten. Es kann auch hilfreich sein, eine Sichtprüfung der Vermehrungsratendaten jeder Behandlung und/oder jedes Replikats mit einem Streudiagramm durchzuführen, das die Daten über die Zeit anzeigt. Dadurch kann eine informelle Beurteilung der potenziellen Effekte über die Zeit durchgeführt werden.

Alle anderen biologischen Daten

Die statistischen Analysen basieren auf der zugrunde liegenden Annahme, dass die Daten mit einer angemessenen Dosiswahl monoton sein werden. Deshalb wird angenommen, dass die Daten monoton sind und sie werden formell mithilfe von linearen und quadratischen Kontrasten auf Monotonie bewertet. Wenn die Daten monoton sind, ist ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest aus den Medianen der Replikate (wie in OECD 2006 empfohlen) empfehlenswert. Wenn der quadratische Kontrast signifikant ist und der lineare Kontrast nicht, werden die Daten als nicht monoton angesehen.

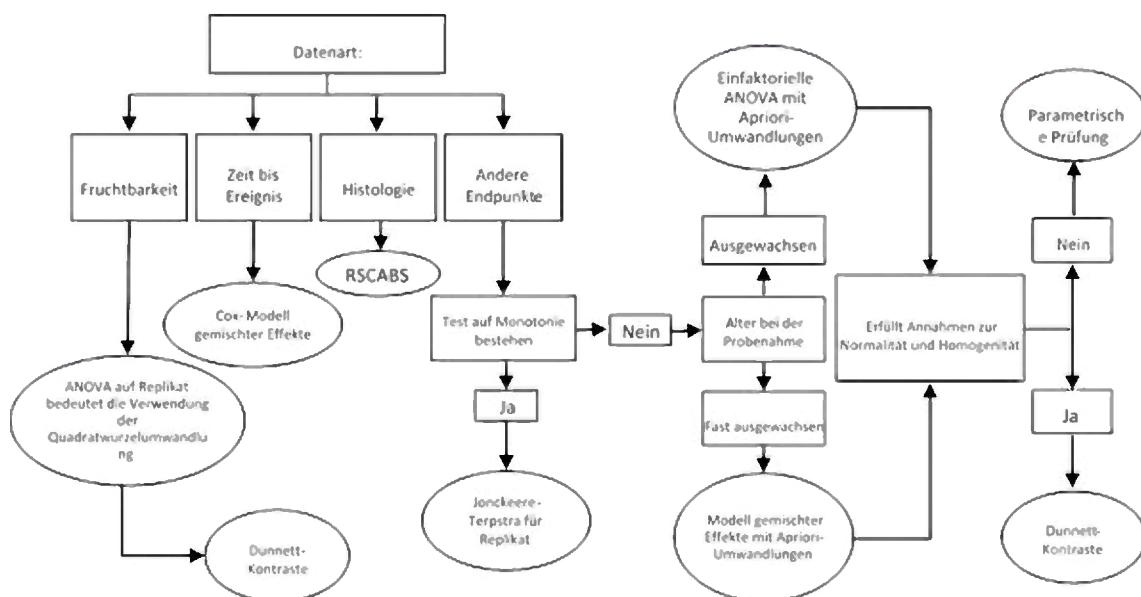
Wenn die Daten nicht monoton sind, insbesondere aufgrund der reduzierten Reaktion auf die höchste oder die höchsten zwei Behandlungen, sollte die Zensur des Datensatzes erwogen werden, sodass die Analyse ohne diese Behandlungen durchgeführt werden kann. Diese Entscheidung muss mit fachlichem Urteilsvermögen und allen verfügbaren Daten, insbesondere denen, die bei diesen Behandlungsniveaus eine offensichtliche Toxizität anzeigen, getroffen werden.

Für Gewicht und Länge werden keine Transformationen empfohlen, obwohl sie gelegentlich erforderlich sein könnten. Es wird jedoch eine log-Transformation für die Vitellogenin-Daten empfohlen; eine Quadratwurzeltransformation wird für die SSC-Daten empfohlen (Afterflosse und Papillen); eine Arkussinuswurzel-Transformation wird für die Daten zum proportionalen Schläpfen, dem Prozentsatz an Überlebenden, dem Geschlechtsverhältnis und dem Prozentsatz an fruchtbaren Eiern empfohlen. Die Zeit bis zum Schläpfen und die Zeit bis zum ersten Ablaichen sollten als Zeit-bis-Ereignisdaten behandelt werden, wobei individuelle Embryos, die nicht im definierten Zeitraum schlüpfen, oder Replikate, die niemals ablaichen, als rechts-zensierte Daten behandelt werden. Die Zeit bis zum Schläpfen sollte über den medianen Tag des Schläpfens jedes Replikats berechnet werden. Diese Endpunkte sollten mithilfe eines proportionalen Cox-Gefahrenmodells mit gemischten Effekten analysiert werden.

Die biologischen Daten aus adulten Proben haben eine Messung pro Replikat, das heißt, dass es einen XX-Fisch und einen XY-Fisch pro Replikataquarium gibt. Deshalb wird empfohlen, dass eine Einweg-ANOVA auf den Replikatmittelwerten durchgeführt wird. Wenn die Annahmen von ANOVA (Normalität und Varianzhomogenität wie auf den Residuen der ANOVA durch den Shapiro-Wilks-Test bzw. den Levene-Test bewertet) erfüllt werden, sollten die Dunnett-Kontraste verwendet werden, um Behandlungen zu bestimmen, die sich von der Kontrolle unterscheiden. Auf der anderen Seite sollte ein Dunn-Test durchgeführt werden, wenn die Annahmen der ANOVA nicht erfüllt werden, um zu bestimmen, welche Behandlungen sich von der Kontrolle unterschieden. Ein ähnliches Verfahren wird für Daten empfohlen, die in der Form von Prozentsätzen vorliegen (Fertilität, Schläpfen und Überleben).

Die biologischen Daten aus den subadulten Proben haben 1 bis 8 Messungen pro Replikat, d. h. es kann eine variable Anzahl von Tieren geben, die zum Replikatmittelwert für jedes genotypische Geschlecht beitragen. Deshalb wird es empfohlen, dass ein ANOVA-Modell mit gemischten Effekten und dann die Dunnett-Kontraste verwendet werden, wenn die Annahmen zur Normalität und der Varianzhomogenität erfüllt wurden (auf den Rückständen der ANOVA mit gemischten Effekten). Es sollte ein Dunn-Test durchgeführt werden, wenn sie nicht erfüllt wurden, um zu bestimmen, welche Behandlungen sich von der Kontrolle unterschieden.

Abbildung 2: Flussdiagramm für die empfohlenen statistischen Verfahren für die MEOGRT-Datenanalyse.



Literaturhinweise

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

- (2) Cameron AC und Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y und Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. Auflage, John Wiley and Sons, New York

C.53 THE LARVAL AMPHIBIAN GROWTH AND DEVELOPMENT ASSAY (LAGDA)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 241 (2015). Angesichts des Risikos, dass in der Umwelt vorhandene Chemikalien Menschen und wild lebende Pflanzen und Tiere beeinträchtigen könnten, muss ein Test zur Identifizierung und Charakterisierung der nachteiligen Folgen der Exposition gegenüber giftigen Chemikalien bei Amphibien entwickelt und validiert werden. Die OECD-Testleitlinie des Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) beschreibt eine Toxizitätsprüfung mit einer Amphienspezies, die das Wachstum und die Entwicklung von der Befruchtung bis zur frühen Jungtierphase berücksichtigt. Dieser Test (normalerweise 16 Wochen) beurteilt die frühe Entwicklung, Metamorphosen, das Überleben, das Wachstum und die teilweise Geschlechtsreife. Er ermöglicht auch die Messung einer Folge an anderen Endpunkten, die die diagnostische Beurteilung von Chemikalien mit mutmaßlicher endokriner Wirkung (EDCs) oder anderen Arten von entwicklungs- und reproductionstoxischen Stoffen ermöglicht. Dieses in dieser Prüfmethode beschriebene Verfahren wird aus der Validierungsarbeit der US-Umweltschutzbehörde zu afrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) mit Unterstützungsarbeit in Japan (1) abgeleitet. Obwohl andere amphibiae Spezies an ein Wachstums- und Entwicklungsprüfprotokoll angepasst werden könnten, wobei die Fähigkeit, das genetische Geschlecht zu bestimmen, eine wichtige Komponente ist, gelten die in dieser Prüfmethode beschriebenen spezifischen Methoden und Beobachtungsendpunkte ausschließlich für *Xenopus laevis*.
2. Der LAGDA dient als höherstufiger Test mit einer Amphibie zur Sammlung umfassenderer Informationen zur Konzentrationsreaktion hinsichtlich unerwünschter Auswirkungen, die sich zur Verwendung bei der Gefahrenidentifizierung und -charakterisierung und bei der Bewertung des ökologischen Risikos eignen. Der Test passt bei Stufe 4 des OECD-Rahmenkonzepts zur Prüfung und Bewertung der endokrinen Disruptoren, wobei In-vivo-Tests auch Daten zu unerwünschten Auswirkungen auf endokrinrelevante Endpunkte bieten (2). Das allgemeine experimentelle Design umfasst die Exposition von *X. laevis*-Embryos im Nieuwkoop und Faber (NF) Stadium 8–10 (3) gegenüber mindestens vier Konzentrationen an Prüfchemikalien (allgemein im Abstand von nicht weniger als einem halben Logarithmus) und Kontrollen bis 10 Wochen nach der medianen Zeit zum NF-Stadium 62 bei der Kontrolle, wobei zwischenzeitlich eine Teilstichprobe im NF-Stadium 62 genommen wird (≤ 45 nach der Befruchtung; normalerweise ungefähr 45 Tage (dpf). Es

gibt vier Replikate in jeder Prüfkonzentration mit acht Replikaten für die Kontrolle. Im Laufe der Exposition bewertete Endpunkte (bei der zwischenzeitlichen Teilstichprobe und endgültige Probenahme bei Beendigung des Tests) umfassen diejenigen, die die verallgemeinerte Toxizität angeben: Bestimmung von Mortalität, abnormalen Verhalten und Wachstum (Länge und Gewicht), sowie Endpunkte, die entwickelt wurden, um die spezifischen Wirkweisen der endokrinen Toxizität zu charakterisieren, die auf Östrogen, Androgen oder über die Schilddrüse vermittelte physiologische Prozesse abzielen. Die Methode hat ihren Hauptschwerpunkt auf den potenziellen populationsrelevanten Effekten (nämlich Einfluss auf Überleben, Entwicklung, Wachstum und Fortpflanzungsentwicklung) für die Berechnung einer No Observed Effect Concentration (NOEC) oder einer Effektkonzentration, die x % Änderung (ECx) im gemessenen Endpunkt hervorrufen kann. Obwohl angemerkt werden sollte, dass ECx-Ansätze sich selten für große Studien dieser Art eignen, bei denen die Erhöhung der Anzahl an Prüfkonzentrationen zur Bestimmung der gewünschten ECx unpraktisch sein könnte. Es sollte ebenfalls angemerkt werden, dass die Methode nicht die Fortpflanzungsphase selbst abdeckt. Die in dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

3. Aufgrund der begrenzten Anzahl an geprüften Chemikalien und Laboren, die an der Validierung dieses eher komplexen Tests beteiligt sind – insbesondere die Inter-Laborreproduzierbarkeit wird bisher nicht mit experimentellen Daten dokumentiert – wird erwartet, dass die OECD-Testleitlinie 241 überarbeitet und wenn erforderlich mit Blick auf die gewonnene Erfahrung aktualisiert wird, wenn eine ausreichende Anzahl an Studien verfügbar ist, um den Einfluss dieses neuen Studiendesigns zu ermitteln. Der LAGDA ist ein wichtiger Test, um potenzielle Mitverursacher des Rückgangs der Amphibienpopulation zu ermitteln, indem er die Auswirkungen der Exposition gegenüber Chemikalien während des sensiblen Larvenstadiums bewertet, in dem Auswirkungen auf das Überleben und die Entwicklung, einschließlich der normalen Entwicklung der Fortpflanzungsorgane, die Populationen negativ beeinflussen können.
4. Der Test wurde entwickelt, um apikale Effekte aufgrund endokriner und nicht-endokriner Mechanismen zu erkennen, und umfasst diagnostische Endpunkte, die teilweise für wichtige endokrine Modalitäten spezifisch sind. Es sollte angemerkt werden, dass es bis zur Entwicklung des LAGDA keinen validierten Test gab, der diese Funktion für Amphibien übernahm.

5. Vor Beginn des Tests ist es wichtig, Informationen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie zu haben, insbesondere, um die Herstellung stabiler chemischer Lösungen zu gewährleisten. Es ist zudem erforderlich, eine ausreichend sensitive Methode zur Verifizierung der Konzentrationen der Prüfchemikalie zu besitzen. Für den Test sind über eine Dauer von ungefähr 16 Wochen hinweg insgesamt 480 Tiere erforderlich, d. h. *X. laevis*-Embryos (oder 640 Embryos, wenn eine Lösungsmittelkontrolle verwendet wird), um eine ausreichende Aussagekraft des Tests für die Bewertung der populationsrelevanten Endpunkte wie Wachstum, Entwicklung und Geschlechtsreife zu gewährleisten.
6. Bevor die Prüfmethode zum gesetzlich vorgeschriebenen Test eines Gemischs angewendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für solche Zwecke geeignete Ergebnisse liefert. Zudem bewertet dieser Test nicht die Fruchtbarkeit direkt, deshalb ist es eventuell auf einer fortgeschritteneren Ebene als Niveau 4 des OECD-Rahmenkonzepts zur Prüfung und Bewertung endokriner Disruptoren nicht anwendbar.

WISSENSCHAFTLICHE BASIS FÜR DIE PRÜFMETHODE

7. Vieles unseres aktuellen Verständnisses der Amphibienbiologie wurde mithilfe der Labormodellspezies *X. laevis* erhalten. Diese Spezies kann regelmäßig im Labor gezüchtet werden, die Ovulation kann mithilfe von humanem Choriongonadotropin (hCG) eingeleitet werden und Tierbesatze sind umgehend von gewerblichen Züchtern verfügbar.
8. Wie bei allen Wirbeltieren unterliegt die Fortpflanzung bei Amphibien der Kontrolle der Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse (HPG) (4). Östrogene und Androgene sind Mediatoren dieses Endokrinsystems und leiten die Entwicklung und Physiologie der sexuell dimorphen Gewebe. Es gibt drei bestimmte Phasen im Lebenszyklus von Amphibien, in denen diese Achse besonders aktiv ist: (1) gonadale Unterscheidung während der larvalen Entwicklung, (2) Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale und Gonadenreifung während der Jungtierphase und (3) funktionale Fortpflanzung von adulten Tieren. Jedes dieser drei Entwicklungsfenster ist wahrscheinlich anfällig für Endokrinstörungen aufgrund bestimmter Chemikalien wie Östrogenen und Androgenen, was schließlich zu einem Verlust der reproduktiven Leistungsfähigkeit durch die Organismen führt.
9. Die Gonaden beginnen im NF-Stadium 43 mit der Entwicklung, wenn der bipotenzielle Genitalkamm sich zu entwickeln beginnt. Die Unterscheidung der Gonaden beginnt im NF-Stadium 52, wenn primordiale Keimzellen entweder zu medullärem Gewebe migrieren (Männchen) oder in der kortikalen Region (Weibchen) der sich entwickelnden Gonaden

bleiben (3). In den 1950er-Jahren wurde erstmals berichtet, dass dieser Prozess der sexuellen Unterscheidung der Gonaden für eine chemische Veränderung bei *Xenopus* anfällig ist (5) (6). Die Exposition von Larven gegenüber Estradiol während dieses Zeitraums der Gonadenunterscheidung führt zu einer Geschlechtsumkehrung bei Männchen, sodass sie im ausgewachsenen Alter vollständig funktionale Weibchen sind (7) (8). Die funktionale Geschlechtsumkehrung von Weibchen in Männchen ist ebenfalls möglich und wurde nach der Implantation von Hodengewebe in Larven berichtet (9). Eine Exposition gegenüber einem Aromatasehemmer führt jedoch auch zu einer funktionalen Geschlechtsumkehrung bei *X. tropicalis* (10); es wurde nicht gezeigt, dass dies auch bei *X. laevis* auftritt. Historisch gesehen wurden giftige Wirkungen auf die gonadale Unterscheidung durch die histologische Untersuchung der Gonaden bei Metamorphose bewertet und die Geschlechtsumkehrung konnte nur anhand einer Analyse der Geschlechterverhältnisse bestimmt werden. Bis vor Kurzem gab es kein Mittel zur direkten Bestimmung des genetischen Geschlechts von *Xenopus*. Jedoch ermöglichte die kürzliche Einführung von geschlechtsbezogenen Markern bei *X. laevis* die Bestimmung des genetischen Geschlechts sowie die direkte Identifizierung der Tiere mit umgekehrtem Geschlecht (11).

10. Bei Männchen wird die Jungtierentwicklung fortgesetzt, während sich die Blutspiegel von Testosteron in Übereinstimmung mit der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale sowie der Entwicklung der Hoden erhöhen. Bei Weibchen wird Estradiol von den Eierstöcken produziert, was zu einem Auftreten von Vitellogenin (VTG) in vitellogenen Eizellen in den Eierstöcken und der Entwicklung von Eileitern führt (12). Eileiter sind sekundäre Geschlechtsmerkmale der Weibchen, die während der Fortpflanzung in der Eizellenreifung fungieren. Eihüllen werden auf die Außenseite der Eizellen aufgetragen, während diese durch den Eileiter wandern, sich im Eibeutel sammeln und bereit für die Befruchtung sind. Die Eileiterentwicklung scheint durch Östrogene geregelt zu sein, während die Entwicklung mit dem Estradiolspiegel im Blut bei *X. laevis* (13) und *X. tropicalis* korreliert (12). Die Entwicklung von Eileitern bei Männchen nach der Exposition gegenüber polychlorierten Biphenyl-Verbundstoffen (14) und 4-*tert*-Octylphenol (15) wurde berichtet.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Das Testdesign umfasst die Exposition von *X. laevis*-Embryos im NF-Stadium 8–10 gegenüber vier verschiedenen Konzentrationen an Prüfchemikalien über den Wasserweg sowie Kontrollen bis 10 Wochen nach der medianen Zeit zum NF-Stadium 62 bei der Kontrolle mit einer zwischenzeitlichen Teilstichprobe im NF-Stadium 62. Während es

möglich sein kann, höchst hydrophobische Chemikalien über die Zuleitung zu dosieren, gab es bisher nur wenig Erfahrung bei der Verwendung dieses Expositionswegs in diesem Test. Es gibt vier Replikate in jeder Prüfkonzentration mit acht Replikaten für jede verwendete Kontrolle. Im Laufe der Exposition bewertete Endpunkte umfassen diejenigen, die die verallgemeinerte Toxizität angeben: Bestimmung von Mortalität, abnormalem Verhalten und Wachstum (Länge und Gewicht), sowie Endpunkte, die entwickelt wurden, um die spezifischen Wirkweisen der endokrinen Toxizität zu charakterisieren, die auf Östrogen, Androgen oder über die Schilddrüse vermittelte physiologische Prozesse abzielen (d. h. Histopathologie der Schilddrüse, Histopathologie der Gonaden und Gonadengänge, abnormale Entwicklung, Plasma-Vitellogenin (optional) und genotypische/phänotypische Geschlechtsverhältnisse).

TESTVALIDITÄTSKRITERIEN

12. Es gelten die folgenden Kriterien für die Testvalidität:

- Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs sollte während der gesamten Prüfdauer $\geq 40\%$ des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;
- die Wassertemperatur sollte im Bereich von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ liegen und das Inter-Replikat und die Inter-Behandlungsdifferenzen sollten $1,0^\circ\text{C}$ nicht überschreiten;
- der pH-Wert der Prüflösung sollte zwischen 6,5 und 8,5 gehalten werden und das Inter-Replikat und die Inter-Behandlungsdifferenzen sollten 0,5 nicht überschreiten;
- es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von $\pm 20\%$ bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden;
- die Mortalität über die Expositionsdauer hinweg sollte in jedem Replikat in den Kontrollen $\leq 20\%$ betragen;
- $\geq 70\%$ Viabilität im Laich, der zum Starten der Studie ausgewählt wurde;
- die mediane Zeit bis zum NF-Stadium 62 der Kontrollen sollte ≤ 45 Tage betragen.
- Das mittlere Gewicht der Prüforganismen sollte im NF-Stadium 62 und bei der Beendigung des Tests bei Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen (falls verwendet) $1,0 \pm 0,2$ bzw. $11,5 \pm 3$ g erreichen.

13. Obwohl dies kein Validitätskriterium ist, wird empfohlen, dass mindestens drei Behandlungsniveaus mit drei unkompromittierten Replikaten für die Analyse zur Verfügung stehen. Die übermäßige Mortalität, die eine Behandlung umfasst, wird definiert als > 4 Mortalitäten (> 20 %) in 2 oder mehr Replikaten, die nicht durch einen technischen Fehler erklärt werden können. Für die Analysen müssen mindestens drei Behandlungskonzentrationen ohne offensichtlich toxische Wirkung verfügbar sein. Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität umfassen insbesondere Treiben an der Oberfläche, Liegen auf dem Beckenboden, umgekehrtes oder unregelmäßige Schwimmen, mangelndes Auftauchen und keine Reaktion auf Reize, morphologische Abnormalitäten (z. B. Gliedmaßenmissbildungen), hämorrhagische Läsionen und Unterleibsödeme.
14. Wird eine Abweichung von den Testvaliditätskriterien beobachtet, sollte geprüft werden, welche Folgen dies für die Zuverlässigkeit der Testergebnisse hat, und diese Abweichungen und Erwägungen sollten in den Prüfbericht aufgenommen werden.

BESCHREIBUNG DER METHODEN

Apparatur

15. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

- (a) Temperaturregelung (z. B. Heiz- oder Kühlgeräte, einstellbar auf $21 \pm 1^\circ\text{C}$);
- (b) Thermometer;
- (c) binokulares Stereomikroskop und Sezierinstrumente;
- (d) Digitalkamera mit einer Auflösung von mindestens 4 Megapixeln und mit Mikroskopfunktion (falls erforderlich);
- (e) Analysewaage mit einer Messgenauigkeit von 0,001 mg oder 1 µg;
- (f) Messgerät für gelösten Sauerstoff und pH-Messgerät;
- (g) Gerät zur Messung der Lichtintensität (Anzeige in lx).

Wasser

Quelle und Qualität

16. Für den Test kann beliebiges vor Ort verfügbares Verdünnungswasser (z. B. Quellwasser oder mit Aktivkohle gefiltertes Leitungswasser) verwendet werden, bei dem *Krallenfrosch-Larven* normal wachsen und sich entwickeln können, und es muss nachgewiesen werden, dass in diesem Wasser ein normales Wachstum stattfinden kann. Da die Wasserqualität je nach Standort von Region zu Region sehr unterschiedlich sein kann, ist die Wasserqualität insbesondere dann zu analysieren, wenn keine historischen Daten über die Verwendbarkeit des Wassers für die Aufzucht von Amphibienlarven verfügbar sind. Das Wasser ist auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), Pestizide, den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen, bevor die Tests beginnen, und/oder beispielsweise alle sechs Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist. Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 2 aufgeführt.

Jodkonzentration des Prüfwassers

17. Damit die Schilddrüse Schilddrüsenhormone synthetisieren kann, um die normale Metamorphose zu unterstützen, sollte für die Larven im Wasser und im Futter ausreichend Jod verfügbar sein. Gegenwärtig liegen keine empirisch ermittelten Leitlinien für mindestens erforderliche Jodkonzentrationen im Futter oder im Wasser vor, um die ordnungsgemäße Entwicklung zu gewähren. Die Verfügbarkeit von Jod kann jedoch die Reaktionsfähigkeit des Schilddrüsensystems gegenüber den Schilddrüsenwirkstoffen beeinflussen, und es ist bekannt, dass Jod die Grundaktivität der Schilddrüse ändert, was bei der Auswertung der Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen der Schilddrüse zu beachten ist. Basierend auf der vorherigen Arbeit wurde die erfolgreiche Leistung des Tests aufgezeigt, wenn die Jodkonzentration des Verdünnungswassers (I^-) zwischen 0,5 und 10 $\mu\text{g/l}$ liegt. Idealerweise sollte die minimale Jodkonzentration im Verdünnungswasser während des Tests 0,5 $\mu\text{g/l}$ betragen (als Natrium- oder Kaliumsalz hinzugefügt). Wenn das Prüfwasser aus entionisiertem Wasser rekonstituiert wird, muss Jod in einer Konzentration von mindestens 0,5 $\mu\text{g/l}$ hinzugegeben werden. Die gemessenen Jodkonzentrationen aus dem Prüfwasser (d. h. Verdünnungswasser) und der Zusatz von Jod oder anderen Salzen (wenn verwenden) zum Prüfwasser sollten eingetragen werden. Der Jodgehalt kann ebenfalls in zusätzlich zum Prüfwasser in Lebensmitteln gemessen werden.

Expositionssystem

18. Der Test wurde mit einem Durchflusssystem entwickelt. Bestandteile des Systems, die mit Wasser in Berührung kommen, müssen aus Glas, Edelstahl und/oder anderen chemisch trügen Materialien bestehen. Die Expositionsbecken sollten Glas- oder Edelstahlaquarien sein und das nutzbare Volumen des Beckens sollte zwischen 4,0 und 10,0 l liegen (Mindestwassertiefe von 10 bis 15 cm). Das System sollte für sämtliche Expositionskonzentrationen, eine Kontrolle und eine Lösungsmittelkontrolle ausgelegt sein, wenn erforderlich mit vier Replikaten pro Behandlung und acht in den Kontrollen. Der Durchfluss in die einzelnen Becken muss konstant sein; dabei sind sowohl die Aufrechterhaltung der biologischen Bedingungen als auch die Exposition durch die Chemikalie zu berücksichtigen. Die Durchflussraten sollten angemessen sein (z. B. mindestens 5 Beckenumsätze pro Tag), um chemische Konzentrationsrückgänge aufgrund des Stoffwechsels sowohl der in den Aquarien vorhandenen Prüforganismen als auch der aquatischen Mikroorganismen oder der abiotischen Abbauprozesse (Hydrolyse, Photolyse) oder Verlust (Verflüchtigung, Sorption) zu vermeiden. Die Behandlungsbecken sollten einer zufälligen Position im Expositionssystem zugewiesen werden, um die potenziellen Positionseffekte zu reduzieren, einschließlich geringfügiger Abweichungen der Temperatur, Lichtstärke, usw. Weitere Informationen zum Aufbau von Durchfluss-Expositionssystemen können dem ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (16) entnommen werden.

Chemikalienlieferung: Vorbereitung der Prüflösungen

19. Um Prüflösungen im Expositionssystem herzustellen, sollte die Stammlösung der Prüfchemikalie mit einer geeigneten Pumpe oder einem anderen Gerät in das Expositionssystem dosiert werden. Die Durchflussrate der Stammlösung sollte gemäß der analytischen Bestätigung der Prüflösungen vor der Einleitung der Exposition kalibriert und während des Tests regelmäßig volumetrisch kontrolliert werden. Die Prüflösung sollte in jeder Kammer mit mindestens 5 Volumenerneuerungen/Tag erneuert werden.
20. Die Prüfchemikalie kann je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften auf unterschiedliche Weise in das Prüfsystem eingebracht werden. Daher sollten vor dem Test grundlegende Informationen über die Chemikalie, die für die Bestimmung ihrer Prüfbarkeit relevant sind, eingeholt werden. Zu nützlichen Informationen über Prüfchemikalien-spezifischen Eigenschaften zählen Strukturformel, Molekulargewicht, Reinheit, Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, pK_a und K_{ow} , Wasserlöslichkeit (vorzugsweise im Prüfmedium) und Dampfdruck sowie die Ergebnisse eines Tests auf leichte biologische Abbaubarkeit (Prüfmethode C.4 (17) oder Prüfmethode C.29 (18)). Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, der

zu entnehmen ist, ob erhebliche Verluste der Prüfchemikalie aufgrund von Verdampfung zu erwarten sind. Die Durchführung dieses Tests ohne die oben aufgeführten Informationen sollte sorgfältig erwogen werden, da das Studiendesign von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie abhängen wird und Testergebnisse ohne diese Daten schwer zu interpretieren oder bedeutungslos sein könnten. Ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfchemikalie in den Prüflösungen mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Wasserlösliche Prüfchemikalien können in Aliquoten des Verdünnungswassers in einer Konzentration gelöst werden, mit der die für den Test vorgesehene Zielkonzentration in einem Durchflusssystem erreicht wird. Chemikalien, die bei Raumtemperatur flüssig oder fest und in Wasser mäßig löslich sind, erfordern Flüssig:Flüssig- oder Flüssig:Fest-Sättigungssäulen (z. B. Glaswollensäule) (19). Während es möglich sein kann, äußerst hydrophobische Prüfchemikalien über die Zuleitung zu dosieren, gab es nur wenig Erfahrung bei der Verwendung dieses Expositionswegs in diesem Test.

21. Die Prüflösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einröhren der Prüfchemikalie in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (z. B. Rührwerk und/oder Ultraschall) hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen/-systeme oder passive Dosierungsmethoden (20) verwendet werden. Vorzugsweise ist ein zweitlösungsmittelfreies Prüfsystem zu verwenden; die Prüfchemikalien haben jedoch unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften, die wahrscheinlich unterschiedliche Ansätze bei der chemischen Aufbereitung des Wassers erfordern. Vorzugsweise sollten weder Lösungsmittel noch Träger verwendet werden: (1) bestimmte Lösungsmittel selbst können zu einer Toxizität und/oder unerwünschten oder unerwarteten Reaktionen führen, (2) das Prüfen von Chemikalien über ihrer Wasserlöslichkeit (wie dies oft durch die Verwendung von Lösungsmitteln passieren kann) kann zu ungenauen Bestimmungen der effektiven Konzentrationen führen, (3) die Verwendung von Lösungsmitteln bei längerfristigen Tests kann zur starken Ausprägung eines Biofilms im Zusammenhang mit mikrobieller Aktivität führen, was die Umweltbedingungen sowie die Fähigkeit, Expositions konzentrationen beizubehalten, beeinträchtigt und (4) in Abwesenheit historischer Daten zeigt, dass das Lösungsmittel das Ergebnis der Studie nicht beeinflusst, die Verwendung von Lösungsmitteln erfordert eine Lösungsmittelkontrollbehandlung, die mit signifikanten Implikationen hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere einhergeht, da zusätzliche Tiere erforderlich sind, um den Test durchzuführen. Bei schwierig zu prüfenden Chemikalien kann ein Lösungsmittel als letztes Mittel eingesetzt werden und es sollte das OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (21)

herangezogen werden, um die beste Methode zu bestimmen. Die Wahl des Lösungsmittels wird durch die chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien und die Verfügbarkeit der historischen Kontrolldaten des Lösungsmittels bestimmt. Im Falle eines Mangels der historischen Daten sollte die Eignung vor der Durchführung der definitiven Studie bestimmt werden. Falls diese Verwendung eines Lösungsmittels unvermeidbar ist und eine mikrobielle Aktivität (Bildung eines Biofilms) auftritt, wird während des Tests (mindestens wöchentlich) eine Aufzeichnung/Berichterstattung der Biofilmbildung pro Becken empfohlen. Idealerweise sollte die Lösungsmittelkonzentration bei der Lösungsmittelkontrolle und allen Prüfbehandlungen konstant gehalten werden. Wenn die Konzentration des Lösungsmittels nicht konstant gehalten wird, sollte die höchste Konzentration des Lösungsmittels bei der Prüfbehandlung auch bei der Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. In Fällen, bei denen ein Lösungsmittelträger verwendet wird, sollten die maximalen Lösungsmittelkonzentrationen 100 µl/l oder 100 mg/l (21) nicht überschreiten und es wird empfohlen, die Lösungsmittelkonzentration so niedrig wie möglich zu halten (z. B. $\leq 20 \mu\text{l/l}$), um potenzielle Effekte des Lösungsmittels auf gemessene Endpunkte zu vermeiden (22).

Versuchstiere

Prüfspezies

22. Die Prüfspezies ist *X. laevis*, da sie: (1) regelmäßig in Laboren auf der ganzen Welt gezüchtet wird (2), einfach über kommerzielle Händler zugänglich sind und (3) das genetische Geschlecht bestimmt werden kann.

Hälerung der adulten Tiere und Zucht

23. Die angemessene Hälerung und Züchtung von *X. laevis* wird in einem normierten Leitfaden beschrieben (23). Unterkunft und Pflege von *X. laevis* werden ebenso in Read (24) beschrieben. Um die Laichreifung zu induzieren, wird drei bis fünf Paaren von adulten weiblichen und männlichen Tieren intraperitoneal humanes Choriongonadotropin (hCG) injiziert. Weibchen und Männchen werden beispielsweise mit ungefähr 800–1000 IU bzw. 500–800 IU hCG, das in 0,6–0,9 % Kochsalzlösung gelöst wurde, injiziert (oder Frosch-Ringer-Lösung, einem isotonischen Kochsalz zur Verwendung bei Amphibien; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Die Injektionsvolumen sollten ungefähr 10 µl/g Körpermassen betragen (~1000 µl). Die Zuchtpaare werden anschließend in großen Becken ohne Störungen unter statischen Bedingungen gehalten, um den Amplexus zu fördern. Die Unterseite der Brutbecken sollte

jeweils einen Zwischenboden aus Edelstahlgitter (z. B. Öffnungen von 1,25 cm) enthalten, durch den der Laich auf den Boden des Beckens sinken kann. Frösche, die am späten Nachmittag eine Injektion mit hCG erhalten haben, laichen meist am Vormittag des Folgetages. Nachdem eine hinreichende Anzahl an Eiern abgelegt und befruchtet wurde, sind die adulten Tiere aus den Brutbecken zu nehmen. Die Eier werden dann gesammelt und die Eihüllen mithilfe einer Behandlung mit L-Cystein entfernt (23). Eine 2 %-ige L-Cystein-Lösung sollte vorbereitet und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 8,1 angepasst werden. Diese 21 °C-Lösung wird zu einem 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit den Eiern eines einzelnen Laichs hinzugefügt und behutsam ein bis zwei Minuten lang geschwenkt und dann 6–8 Mal gründlich mit 21 °C warmem Kulturwasser abgespült. Die Eier werden dann in eine kristallisierende Schale gegeben und auf > 70 % lebensfähig mit minimalen Abnormalitäten bei der bei Embryos stattfindenden Zellteilung festgelegt.

VERSUCHSPLAN

Prüfkonzentrationen

24. Es wird empfohlen, mindestens vier chemische Konzentrationen und angemessene Kontrollen zu verwenden (einschließlich Lösungsmittelkontrollen, falls erforderlich). Allgemein wird eine Konzentrationstrennung (Abstandsfaktor) empfohlen, die 3,2 nicht überschreitet.
25. Für die Zwecke dieses Tests sollten die Ergebnisse aus bestehenden Amphibienstudien sofern möglich bei der Bestimmung der höchsten Prüfkonzentration verwendet werden, um Konzentrationen zu vermeiden, die offensichtlich toxisch sind. Beispielsweise können Informationen aus quantitativen Strukturaktivitätsbeziehungen, Analogien und Daten aus bestehenden Amphibienstudien wie dem Amphibian Metamorphosis Assay, Prüfmethoden C.38 (25) und dem Frog Embryo Teratogenesis Test – *Xenopus* (23) und/oder Fischtests wie Prüfmethoden C.48, C.41 und C.49 (26) (27) (28) zur Einstellung dieser Konzentration beitragen. Vor dem Durchlauf von LAGDA kann eventuell ein Bereichsfindungsexperiment durchgeführt werden. Es wird empfohlen, dass die Bereichsfindungsexposition innerhalb von 24 Stunden nach der Befruchtung eingeleitet und noch 7–14 Tage (oder ggf. länger) fortgesetzt werden und die Testkonzentrationen so eingestellt sind, dass die Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen nicht größer sind als Faktor 10. Die Ergebnisse des Bereichsfindungsexperiments sollten dazu dienen, die höchsten Prüfkonzentrationen im LAGDA einzustellen. Bitte beachten, dass wenn ein Lösungsmittel verwendet werden muss,

die Eignung des Lösungsmittels (d. h. ob es einen Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat oder nicht) als Teil der Bereichsfundungsstudie bestimmt wird.

Replikate innerhalb der Behandlungsgruppen und Kontrollen

26. Es sollten mindestens vier Replikattanks pro Prüfkonzentration und mindestens acht Replikate für die Kontrollen (und ggf. Lösungsmittelkontrolle) verwendet werden (d. h. die Anzahl der Replikate bei der Kontrolle und einer Lösungsmittelkontrolle sollte zweimal so hoch sein wie die Anzahl der Replikate jeder Behandlungsgruppe, um eine angemessene statistische Aussagekraft zu gewährleisten). Jedes Replikat sollte höchstens 20 Tiere enthalten. Die Mindestanzahl an verarbeiteten Tieren würde 15 betragen (5 für die Teilstichprobe im NF-Stadium 62 und 10 Jungtiere). Es werden jedoch zu jedem Replikat weitere Tiere hinzugefügt, um die Möglichkeit der Mortalität zu berücksichtigen, während die kritische Zahl 15 im Auge behalten wird.

VERFAHREN

Test-Übersicht

27. Der Test wird mit neu abgelaichten Embryos (NF-Stadium 8–10) eingeleitet und bis in die Entwicklung der Jungfische fortgeführt. Tiere werden täglich auf Mortalität und Anzeichen abnormalen Verhaltens untersucht. Im NF-Stadium 62 wird eine larvale Teilstichprobe (bis zu 5 Tiere pro Replikat) gesammelt und es werden verschiedene Endpunkte untersucht (Tabelle 1). Nachdem alle Tiere im NF-Stadium 66, d. h. Abschluss der Metamorphose, erreicht haben (oder nach 70 Tagen ab der Test-Einleitung, was zuerst eintrifft), wird nach dem Zufallsprinzip eine Tötung vorgenommen (aber ohne Teilstichprobennahme), um die Anzahl der Tiere (10 pro Becken) zu reduzieren (siehe Abschnitt 43) und die verbleibenden Tiere fahren bis 10 Wochen nach der medianen Zeit bis NF-Stadium 62 bei der Kontrolle mit der Exposition fort. Bei Beendigung des Tests (Probenahme bei Jungtieren) werden zusätzliche Messungen durchgeführt (Tabelle 1).

Expositionsbedingungen

28. Eine vollständige Zusammenfassung der Prüfparameter findet sich in Anlage 3. Während der Expositionsduauer sollten jeden Tag der gelöste Sauerstoff, die Temperatur und der pH-Wert der Prüflösungen gemessen werden. Leitfähigkeit, Alkalität und Härte werden einmal pro Monat gemessen. Für die Wassertemperatur der Prüflösungen dürfen die Unterschiede

zwischen den einzelnen Replikaten und den einzelnen Behandlungen (innerhalb eines Tages) 1,0 °C nicht überschreiten. Außerdem dürfen sich einzelnen Replikate und einzelnen Behandlungen nicht um mehr als 0,5 unterscheiden.

29. Die Expositionsbecken können täglich entleert werden, um ungefressenes Futter und Abfallprodukte zu entsorgen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass es nicht zu einer Kreuzkontaminierung der Becken kommt. Belastungen und Traumata für die Tiere sollten auf ein Minimum reduziert werden, insbesondere beim Verschieben und Reinigen von Aquarien sowie bei Änderungen. Stressige Bedingungen/Aktivitäten wie laute und/oder ständige Geräusche, Antippen des Aquariums und Schwingungen im Becken sollten vermieden werden.

Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie

30. Die Exposition wird mit neu abgelaichten Embryos eingeleitet (NF-Stadium 8–10) und bis zehn Wochen nach der medianen Zeit bis NF-Stadium 62 (≤ 45 Tage ab der Test-Einleitung) bei der Kontrollgruppe fortgesetzt. Allgemein beträgt die Dauer des LAGDA 16 Wochen (maximal 17 Wochen).

Test-Einleitung

31. Für die Test-Einleitung verwendete Elterntiere sollten zuvor schon gezeigt haben, dass sie Nachwuchs produzieren können, dessen genetisches Geschlecht bestimmt werden kann (Anlage 5). Nach dem Ablaichen der Elterntiere werden die Embryos gesammelt, mit Cysteine behandelt, um die Eihülle zu entfernen, und auf Lebensfähigkeit überprüft (23). Die Behandlung mit Cystein ermöglicht es, die Embryos während der Überprüfung zu handhaben, ohne dass sie an Oberflächen kleben bleiben. Die Überprüfung findet unter einem Stereomikroskop mit einer Augentropfenflasche in angemessener Größe statt, um nicht lebensfähige Embryos zu entfernen. Für den Test wird es bevorzugt, einen einzigen Laich mit einer Lebensfähigkeit von mehr als 70 % zu verwenden. Embryos im NF-Stadium 8–10 werden nach dem Zufallsprinzip auf die Expositionsbecken mit einer angemessenen Menge an Verdünnungswasser verteilt, bis jedes Becken 20 Embryos enthält. Beim Umsetzen sind die Embryos sorgfältig zu behandeln, um Stressbelastung während der Behandlung zu minimieren und um Verletzungen zu vermeiden. 96 Stunden nach der Befruchtung sollten die Larven schon die Wassersäule hoch geschwommen sein und sich an die Seiten des Beckens geklammert haben.

Fütterungsregime

32. Das Futter und die Fütterungsrate ändern sich in verschiedenen Lebensstadien von *X. laevis* und dies ist ein äußerst wichtiger Aspekt des LAGDA-Protokolls. Eine übermäßige Fütterung während der Larvenphase führt normalerweise zu einem erhöhten Auftreten und Schweregrad von Skoliose (Anlage 8) und sollte vermieden werden. Dahingegen führt eine unzureichende Fütterung während der Larvenphase zu höchst variablen Entwicklungsraten unter den Kontrollen, was die statistische Aussagekraft potenziell kompromittieren oder die Prüfergebnisse beeinträchtigen könnte. In Anlage 4 ist das empfohlene Futter- und Fütterungsregime für Larven und Jungfische von *X. laevis* in Durchflussbedingungen angegeben, aber Alternativen sind ebenfalls zulässig, solange die Prüforganismen zufriedenstellend wachsen und sich entwickeln. Es musst darauf hingewiesen werden, dass das Futter frei von endokrinwirkenden Stoffen wie Sojamehl sein sollte, wenn endokrinspezifische Endpunkte gemessen werden.

Fütterung der Larven

33. Das empfohlene Larvenfutter besteht aus Startfutter für Regenbogenforellen, *Spirulina*-Algenscheiben und Goldfischchips (z. B., TetraFin®-Flocken, Tetra, Deutschland), die in Kulturwasser (oder Verdünnungswasser) gemischt werden. Dieses Gemisch wird drei Mal täglich an Wochentagen und einmal täglich am Wochenende verabreicht. Die Larven werden außerdem ab Tag 8 nach der Befruchtung zweimal täglich an Wochentagen und einmal täglich am Wochenende mit lebenden Salinenkrebsen, *Artemia* spp., 24 Stunden alte nauplii, gefüttert. Die larvale Fütterung, die in jedem Prüfgefäß konsistent sein sollte, sollte den Versuchstieren ein ordentliches Wachstum und eine gute Entwicklung ermöglichen, um die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Test-Ergebnisse zu gewährleisten: (1) die mediane Zeit bis zum NF-Stadium 62 bei den Kontrollen sollte ≤ 45 Tage betragen und (2) ein mittleres Gewicht innerhalb von $1,0 \pm 0,2$ g im NF-Stadium 62 bei den Kontrollen wird empfohlen.

Fütterung der Jungfische

34. Sobald die Metamorphose abgeschlossen wurde, besteht das Fütterungsregime aus sinkendem Premium-Froschfutter, z. B. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (Anlage 4). Für Fröschlein (frühe Jungfrösche) werden die Pellets kurz in einer Kaffeemühle, einem Mixer oder einem Mörser mit Stößel zerkleinert, um ihre Größe zu reduzieren. Sobald die Jungfrösche groß genug sind, um komplett Pellets zu fressen, ist ein Mahlen oder Zerkleinern nicht länger erforderlich. Die Tiere sollten einmal täglich gefüttert werden. Die Fütterung der Jungfrösche sollte ein angemessenes Wachstum und

eine gute Entwicklung der Organismen ermöglichen: ein mittleres Gewicht innerhalb von $11,5 \pm 3$ g bei der Kontrolle der Jungfrösche am Ende des Tests wird empfohlen.

Analytik

35. Vor der Einleitung des Tests sollten die Stabilität der Prüfchemikalie (z. B. Löslichkeit, Abbaubarkeit und Flüchtigkeit) und alle erforderlichen analytischen Methoden z. B. mithilfe bestehender Informationen oder Kenntnisse etabliert werden. Wenn über Verdünnungswasser dosiert wird, dann wird empfohlen, dass Prüflösungen aus jeder Replikatbeckenkonzentration vor der Einleitung des Tests analysiert werden, um die Systemleistung zu verifizieren. Während der Expositionsdauer werden die Konzentrationen der Prüfchemikalie in angemessenen Intervallen bestimmt, vorzugsweise einmal pro Woche für mindestens ein Replikat in jeder Behandlungsgruppe, wobei jede Woche zwischen Replikaten derselben Behandlungsgruppe abgewechselt wird. Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während des gesamten Tests jedoch zufriedenstellend innerhalb der nominellen Konzentration ($\pm 20\%$) gehalten, so können sich die Ergebnisse auf die nominalen oder die gemessenen Werte stützen. Außerdem sollte der Variationskoeffizient (CV) der gemessenen Prüfkonzentrationen über den gesamten Prüfzeitraum hinweg innerhalb einer Behandlung bei 20 % oder weniger in jeder Konzentration gehalten werden. Wenn die gemessenen Konzentrationen nicht innerhalb von 80–120 % der Nennkonzentration bleiben (beispielsweise wenn höchst biologisch abbaubare oder adsorbierende Chemikalien geprüft werden), sollten die Effektkonzentrationen bestimmt und relativ zur arithmetisch gemittelten Konzentration für Durchflusstests ausgedrückt werden.
36. Die Durchflussrate des Verdünnungswassers und der Stammlösung sollte in angemessenen Intervallen (z. B. drei Mal pro Woche) während der Expositionsdauer geprüft werden. Im Falle von Chemikalien, die nicht bei manchen oder allen Nennkonzentrationen erkannt werden können (z. B. aufgrund eines schnellen Abbaus oder Absorption in den Prüfgefäßern oder durch eine Anhäufung markierter Chemikalien in den Körpern der exponierten Tiere), wird empfohlen, dass die Erneuerungsrate der Prüflösung in jeder Kammer angepasst wird, um die Prüfkonzentrationen so konstant wie möglich zu halten.

Beobachtungen und Endpunktmessungen

37. Die im Laufe der Exposition bewerteten Endpunkte sind diejenigen, die auf Toxizität einschließlich Mortalität, abnormales Verhalten wie klinische Anzeichen einer Erkrankung und/oder allgemeine Toxizität und Wachstumsbestimmungen (Länge und Gewicht)

hinweisen, sowie pathologische Endpunkte, die sowohl auf die allgemeine Toxizität als auch auf endokrine Wirkungsweisen reagieren können, die auf Östrogen-, Androgen- oder Schilddrüsen-vermittelte Wege abzielen. Zusätzlich dazu kann die Plasma-VTG-Konzentration optional am Ende des Tests gemessen werden. Die Messung von VTG kann nützlich sein, um die Studienergebnisse im Kontext der endokrinen Mechanismen für vermeintliche EDCs zu verstehen. Die Endpunkte und die Zeitvorgabe für die Messungen werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Endpunktüberblick über LAGDA

Endpunkte*	Täglich	Zwischenprobennahme (Probenahme bei Larven)	Testbeendigung (Probenahme bei Jungtieren)
Mortalitäten und Abnormalitäten	X		
Zeit bis zum NF-Stadium 62		X	
Histo(patho)logie (Schilddrüse)		X	
Morphometrik (Wachstum in Gewicht und Länge)		X	X
Leber-somatischer Index (LSI)			X
Genetische/phänotypische Geschlechterverhältnisse			X
Histopathologie (Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Niere und Leber)			X
Vitellogenin (VTG) (optional)			X

* Alle Endpunkte werden statistisch analysiert.

Mortalität und tägliche Beobachtungen

38. Alle Prüfbecken sind täglich auf tote Tiere zu prüfen und die Anzahl der toten Larven ist zu protokollieren. Bemerkte tote Tiere sind umgehend aus den Becken zu entfernen. Das Entwicklungsstadium der toten Tiere sollte entweder als NF-Vorstadium 58 (Auftreten vor den Vorderbeinen), NF-Stadium 58 bis NF-Stadium 62, NF-Stadium 63 bis NF-Stadium 66 (zwischen NF-Stadium 62 und vollständiger Schwanzabsorption) oder Post-NF-Stadium 66 (nach den Larven) kategorisiert werden. Mortalitäten von mehr als 20 % können auf ungeeignete Prüfbedingungen oder offensichtlich toxische Wirkungen der Prüfchemikalie

hindeuten. Die Tiere neigen dazu, während der ersten paar Tage der Entwicklung nach dem Ablaichen und während des metamorphen Höhepunkts am sensibelsten gegenüber nicht chemisch induzierten Mortalitätsereignissen zu sein. Eine solche Mortalität könnte aus den Kontroldaten ersichtlich sein.

39. Zusätzlich dazu sind Beobachtungen anormalen Verhaltens, deutlich sichtbare Fehlbildungen (z. B. Skoliose) oder Läsionen zu vermerken. Beobachtungen von Skoliose sollten gezählt (Auftreten) und hinsichtlich des Schweregrads eingestuft werden (z. B. nicht bemerkenswert – NR, minimal – 1, mäßig – 2, schwer – 3; Anlage 8). Es sollten Anstrengungen unternommen werden, um sicherzustellen, dass die Prävalenz der mäßigen und schweren Skoliose (z. B. unter 10 % bei den Kontrollen) während der Studie begrenzt wird, obwohl eine höhere Prävalenz von Kontrollabnormalitäten nicht zwingend ein Grund dafür wäre, den Test zu beenden. Normal ist, wenn sich die Larven in der Wassersäule so bewegen, dass sich der Schwanz über dem Kopf befindet, die Schwanzflosse regelmäßig rhythmisch schlägt, die Tiere regelmäßig an die Wasseroberfläche kommen, durch die Kiemen atmen und auf Reize reagieren. Anormal wäre beispielsweise, wenn die Larven auf der Oberfläche treiben, am Boden des Beckens liegen, mit dem Bauch nach oben oder unregelmäßig schwimmen, nicht an die Oberfläche kommen und nicht auf Reize reagieren. Bei Tieren nach der Metamorphose sollten zusätzlich zu den oben genannten abnormalen Verhaltensweisen deutliche Unterschiede bei der Nahrungsaufnahme zwischen Behandlungen aufgezeichnet werden. Erhebliche Fehlbildungen und Läsionen sind etwa morphologische Anomalien (z. B. Fehlbildungen der Beine), blutende Läsionen, Ödeme im Unterleib oder durch Bakterien oder Pilze verursachte Infektionen, um nur einige Beispiele zu nennen. Die Erscheinungen von Läsionen auf den Köpfen der Jungtiere, kurz vor den Nasenlöchern, kann ein Anzeichen für unzureichende Feuchtigkeit sein. Die entsprechenden Beobachtungen sind qualitativer Art; sie sind klinischen Anzeichen für Krankheiten/Stressbelastung vergleichbar und in Relation zu den Tieren in den Kontrollen zu sehen. Wenn in den Becken mit der Prüfchemikalie Fehlbildungen oder Läsionen in größerem Umfang und häufiger auftreten als in den Kontrollen, ist dies als Beleg für eine offensichtliche Toxizität zu betrachten.

Larvale Teilstichprobenahme

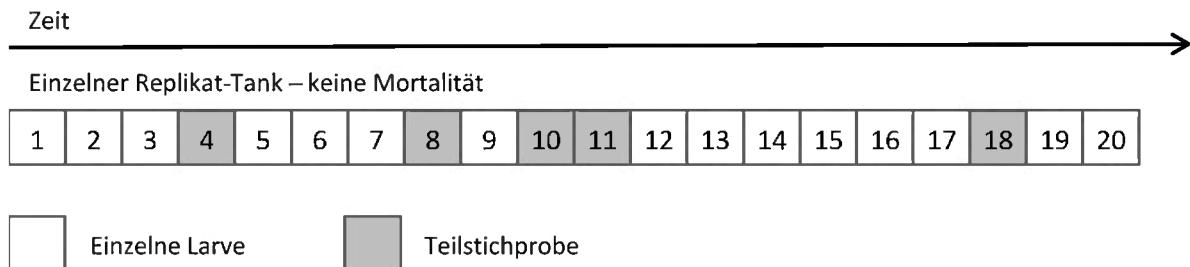
Beschreibung der larvalen Teilstichprobenahme:

40. Die Larven, die NF-Stadium 62 erreicht haben, sollten aus den Becken entfernt und entweder Proben genommen oder die Tiere zum nächsten Teil der Exposition in ein neues Becken gebracht werden, oder sie sollten mithilfe einer Trennwand physikalisch von den

anderen Larven im selben Becken getrennt werden. Die Larven werden täglich überprüft und der Studentag, an dem die einzelnen Larven NF-Stadium 62 erreichen, wird aufgezeichnet. Das definierende Merkmal zur Verwendung in dieser Beurteilung ist die Kopfform. Sobald der Kopf so geschrumpft ist, dass er visuell ungefähr die gleiche Breite hat wie der Rumpf der Larve, und die Vorderbeine sich auf der Mitte des Herzens befinden, dann wird davon ausgegangen, dass diese Larve NF-Stadium 62 erreicht hat.

41. Das Ziel besteht darin, eine Probe von insgesamt fünf Larven im NF-Stadium 62 pro Replikatbecken zu nehmen. Dies sollte komplett nach dem Zufallsprinzip geschehen, aber *a priori* entschieden werden. Ein hypothetisches Beispiel eines Replikatbeckens ist in **Abbildung 1** bereitgestellt. Sollte es in einem bestimmten Becken 20 überlebende Larven geben, wenn die ersten Tiere das NF-Stadium 62 erreichen, sollten fünf zufällige Zahlen zwischen 1 und 20 ausgewählt werden. Larve Nr. 1 ist das erste Tier, das NF-Stadium 62 erreicht und Larve Nr. 20 ist das letzte Tier in einem Becken, das NF-Stadium 62 erreicht. Wenn es 18 überlebende Larven in einem Becken gibt, sollten auf dieselbe Weise fünf zufällige Zahlen zwischen 1 und 18 ausgewählt werden. Dies sollte für jedes Replikatbecken durchgeführt werden, wenn das erste Versuchstier NF-Stadium 62 erreicht. Wenn es Mortalitäten während der Probenahme im NF-Stadium 62 gibt, müssen die verbleibenden Proben basierend darauf, wie viele Larven im < NF-Stadium 62 übrig sind und wie viele weitere Proben erforderlich sind, um eine Gesamtanzahl von fünf Proben aus diesem Replikat zu erhalten, erneut randomisiert werden. An dem Tag, an dem eine Larve das NF-Stadium 62 erreicht, wird auf den vorbereiteten Probenahmeplan verwiesen, um zu bestimmen, ob von diesem Tier eine Probe genommen wird oder ob es physikalisch von den verbleibenden Larven für eine weitere Exposition getrennt wird. Im bereitgestellten Beispiel (Abbildung 1) wird das erste Tier, das NF-Stadium 62 erreicht (d. h. Kästchen Nr. 1) physikalisch von den anderen Larven getrennt, weiter exponiert und der Studentag, an dem dieses Tier das NF-Stadium 62 erreicht hat, wird aufgezeichnet. Anschließend werden die Tiere Nr. 2 und 3 auf dieselbe Weise behandelt wie Nr. 1 und von Tier Nr. 4 wird dann eine Probe für das Wachstum und die Histologie der Schilddrüse genommen (laut diesem Beispiel). Dieses Verfahren wird fortgesetzt, bis das 20. Tier entweder zum Rest der Tiere im Post-NF-Stadium 62 darf oder eine Probe davon genommen wird. Das Randomisierungsverfahren muss gewährleisten, dass für alle Tiere die gleiche Auswahlwahrscheinlichkeit gegeben ist. Dies kann mit einem beliebigen Randomisierungsverfahren sichergestellt werden, aber es ist erforderlich, dass jede Larve an einem beliebigen Punkt im NF-Stadium 62 des Teilstichprobenahmezeitraums wieder in das ursprüngliche Becken gesetzt wird.

Abb. 1: Hypothetisches Beispiel eines Probenahmeregimes im NF-Stadium 62 für ein einzelnes Replikatbecken.



42. Bei der larvalen Teilstichprobenahme werden folgende Endpunkte ermittelt: (1) Zeit bis NF-Stadium 62 (d. h. Anzahl an Tagen zwischen Befruchtung und NF-Stadium 62), (2) äußere Abnormalitäten, (3) Morphometrik (z. B. Gewicht und Länge) und (4) Histologie der Schilddrüse.

Schmerzfreies Töten von Larven

43. Die Teilstichprobe von Larven im NF-Stadium 62 (5 Tiere pro Replikat) sollte getötet werden, indem sie 30 Minuten lang in angemessene Mengen (z. B. 500 ml) einer Anästhetikumlösung getaucht werden (z. B. 0,3 % Lösung von MS-222, Tricainmethansulphonat, CAS.886-86-2). Die MS-222-Lösung sollte mit Natriumbicarbonat auf einen pH-Wert von ungefähr 7,0 gepuffert werden, da ungepufferte MS-222-Lösung sauer ist und die Froschhaut reizt, was zu einer schlechten Absorption und unnötigem zusätzlichen Stress für die Organismen führt.
44. Mithilfe eines Maschentauchnetzes wird eine Larve aus der Versuchskammer entfernt und in die Euthanasielösung transportiert (gelegt). Das Tier wird ordnungsgemäß getötet und ist für die Nekropsie bereit, wenn es nicht mehr auf äußere Reize reagiert, wie beispielsweise das Zwicken der Hinterbeine mit einer Pinzette.

Morphometrik (Gewicht und Länge)

45. Die Messungen des Nassgewichts (auf mg genau) und Kopf-Rumpf-Länge (SVL) (auf 0,1 mm genau) sollten für jede Larve sofort dann durchgeführt werden, wenn sie aufgrund der Betäubung nicht mehr reagieren (Abbildung 2a). Eine Bildgebungsanalysesoftware kann verwendet werden, um die SVL auf einem Foto zu messen. Die Larven sollten vor dem Wiegen trocken getupft werden, um überschüssiges anhaftendes Wasser zu entfernen. Nach

den Messungen der Körpergröße (Gewicht und SVL) sollten deutliche morphologische Abnormalitäten und/oder klinische Anzeichen einer Toxizität, wie beispielsweise Skoliose (siehe Anlage 8), Petechien und Hämorrhoiden aufgezeichnet oder notiert werden und eine digitale Dokumentation wird empfohlen. Beachten Sie, dass Petechien kleine rote oder lila Blutungen in den Hautkapillaren sind.

Gewebegewinnung und -fixierung

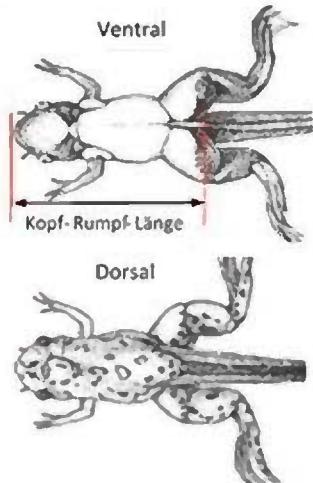
46. Bei der larvalen Teilstichprobe wird die Schilddrüse für die Histologie bewertet. Der untere Torso vor den Vorderbeinen wird entfernt und entsorgt. Der beschnittene Kadaver wird in einer Davidson-Fixierlösung befestigt. Das Volumen der Fixierlösung im Gefäß sollte mindestens 10 Mal so viel betragen wie das ungefähre Volumen der Gewebe. Die Fixierlösung sollte entsprechend bewegt und gedreht werden, um die Gewebe von Interesse angemessen zu fixieren. Sämtliche Gewebe bleiben mindestens 48 Stunden lang in der Davidson-Fixierlösung, jedoch nicht länger als 96 Stunden, zu welchem Zeitpunkt sie in deionisiertem Wasser ausgespült und in 10 % neutral gepuffertem Formalin gelagert werden (1) (29).

Histologie der Schilddrüse

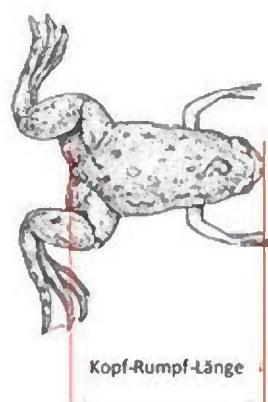
47. Jede larvale Teilstichprobe (fixiertes Gewebe) wird histologisch hinsichtlich der Schilddrüse beurteilt, d. h. Diagnose und Schweregradeinstufung (29) (30).

Abbildung 2: Orientierungspunkte für die Messung der Kopf-Rumpf-Länge für den LAGDA in NF-Stadium 62 (a) und bei Jungfröschen (b). Die definierenden Merkmale des NF-Stadiums 62 (a): der Kopf hat dieselbe Länge wie der Rumpf, die Länge des Riechnervs ist kürzer als der Durchmesser des Riechkolbens (dorsale Ansicht) und die Vorderbeine sind auf deiner Ebene mit dem Herzen (ventrale Ansicht). Die Bilder sind von Nieuwkoop und Faber (1994) übernommen.

a. Larvale Teilstichprobenahme (NF-Stadium 62)



b. Probenahme bei Jungtieren



Ende der Larvenexposition

48. Angesichts der ursprünglichen Anzahl an Larven wird erwartet, dass sich ein kleiner Prozentsatz an Tieren nicht normal entwickelt und die Metamorphose (NF-Stadium 66) nicht innerhalb eines vernünftigen Zeitrahmens abschließt. Der larvale Anteil der Exposition sollte 70 Tage nicht überschreiten. Larven, die am Ende dieses Zeitraums übrig sind, sollten getötet (siehe Abschn. 43), ihr Nassgewicht und ihre SVL gemessen und gemäß Nieuwkoop und Faber, 1994, arrangiert und Entwicklungstechnische Abnormalitäten notiert werden.

Tötung der Tiere nach NF-Stadium 66

49. Zehn Tiere pro Tank sollten von NF-Stadium 66 (vollständige Schwanzresorption) bis zum Ende der Exposition erhalten bleiben. Deshalb sollte eine Massentötung stattfinden, nachdem alle Tiere NF-Stadium 66 erreicht haben, oder nach 70 Tagen (was zuerst eintritt). Tiere nach NF-Stadium 66, die nicht weiter exponiert werden, sollten per Zufallsprinzip ausgewählt werden.

50. Tiere, die nicht für eine weitere Exposition ausgewählt werden, werden getötet (siehe Abschn. 43). Für jedes Tier werden Messungen des Entwicklungsstadiums, des Nassgewichts und der SVL (Abbildung 2b) sowie eine grobe Nekropsie durchgeführt. Das phänotypische Geschlecht (basierend auf der Morphologie der Gonaden) wird als weiblich, männlich oder unbestimmt notiert.

Probenahme bei Jungfischen

Beschreibung der Probenahme bei Jungfischen

51. Die verbleibenden Tiere werden bis 10 Wochen nach der medianen Zeit bis zum NF-Stadium 62 in der Verdünnungswasserkontrolle (und/oder Lösungsmittelkontrolle, wenn relevant) weiter exponiert. Am Ende der Expositionsduer werden die verbleibenden Tiere (maximal 10 Frösche pro Replikat) getötet und die verschiedenen Endpunkte werden gemessen oder bewertet und aufgezeichnet: (1) Morphometrik (Gewicht und Länge), (2) phänotypische/genotypische Geschlechtsverhältnisse, (3) Lebergewicht (Leber-somatischer Index), (4) Histopathologie (Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Leber und Niere) und optional (5) Plasma-VTG.

Schmerzfreies Töten von Fröschen

52. Die Jungfroschproben, Frösche nach der Metamorphose, werden durch eine intraperitoneale Injektion eines Anästhetikums, z. B. 10 % MS-222 in einer angemessenen mit Phosphat gepufferten Lösung, getötet. Es können Proben von Fröschen genommen werden, nachdem diese reaktionslos wurden (normalerweise ungefähr 2 Minuten nach der Injektion, wenn 10 % MS-222 in einer Dosierung von 0,01 ml pro g Frosch verwendet wird). Während die Jungfrösche in ein Anästhetikum mit einer höheren Konzentration getaucht werden könnten (MS-222), hat die Erfahrung gezeigt, dass es mit dieser Methode länger dauert, sie zu betäuben und die Dauer nicht angemessen ist, um eine Probenahme zu ermöglichen. Die Injektion bietet eine effiziente und schnelle Tötung vor der Probenahme. Mit der Probenahme darf erst begonnen werden, wenn die mangelnde Reaktionsfähigkeit der Frösche bestätigt wurde, um sicherzustellen, dass die Tiere tot sind. Wenn die Frösche Anzeichen dafür zeigen, dass sie ziemlich leiden (sehr schwer und der Tod kann zuverlässig vorausgesagt werden) und sie als sterbend angesehen werden, dann sollten die Tiere betäubt und getötet und für die Datenanalyse als Mortalität behandelt werden. Wenn ein Frosch aufgrund von Morbidität getötet wird, sollte dies notiert und gemeldet werden. Je nachdem, wann der Frosch während der Studie getötet wurde, kann er für eine histopathologische Analyse behalten werden (Fixierung des Frosches für mögliche Histopathologie).

Morphometrik (Gewicht und Länge)

53. Die Messungen von Nassgewicht und SVL (Abbildung 2b) sind identisch zu denen, die für die larvale Teilstichprobenahme beschrieben wurden.

Plasma-VTG (Option)

54. VTG ist ein weit akzeptierter Biomarker, der aus der Exposition gegenüber östrogenen Chemikalien entsteht. Für den LAGDA kann Plasma-VTG optional innerhalb der Proben von Jungfröschen gemessen werden (dies kann besonders relevant sein, wenn von der Prüfchemikalie angenommen wird, dass sie ein Östrogen ist).
55. Die Hinterbeine des getöteten Jungfrosches werden aufgeschnitten und das Blut mit einer heparinisierten Kapillare gesammelt (obwohl sich alternative Methoden zum Sammeln von Blut, wie beispielsweise eine Herzpunktur, auch eignen können). Das Blut wird in ein Mikrozentrifugenrörchen (z. B. 1,5 ml Volumen) gegeben und zentrifugiert, um Plasma zu erhalten. Die Plasmaproben sollten bis zur VTG-Bestimmung bei -70 °C oder weniger gelagert werden. Die Plasma-VTG-Konzentration kann über die Methode eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Anlage 6) oder über eine alternative Methode wie die Massenspektrometrie gemessen werden (31). Die für die Spezies spezifischen Antikörper werden aufgrund ihrer höheren Sensitivität bevorzugt.

Bestimmung des genetischen Geschlechts

56. Das genetische Geschlecht jedes Jungfrosches wird auf der Grundlage der von Yoshimoto *et al.* entwickelten Marker bewertet. (11). Um das genetische Geschlecht zu bestimmen, wird (das ganze oder) ein Teil des Hinterbeins (oder anderes Gewebe) bei der Sezierung gesammelt und in einem Mikrozentrifugenrörchen gelagert (Gewebepröben von Fröschen können aus allen Gewebearten entnommen werden). Gewebe kann bis zur Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) bei -20 °C oder weniger gelagert werden. Die Isolierung der DNS aus Geweben kann mit im Handel erhältlichen Kits vorgenommen werden und die Analyse auf Vorhandensein oder Fehlen des Markers wird durch eine Polymerase-Kettenreaktionsmethode (PCR) durchgeführt (Anlage 5). Allgemein beträgt die Konkordanz zwischen dem histologischen Geschlecht und dem Genotyp unter den Kontrolltieren zum Zeitpunkt der Probenahme bei Jungfröschen in der Kontrollgruppe mehr als 95 %.

Gewebegewinnung und -fixierung für die Histopathologie

57. Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Nieren und Lebern werden bei der endgültigen Probenahme für die histologische Analyse gesammelt. Die Bauchhöhle wird geöffnet und die Leber wird seziert und gewogen. Dann werden die Verdauungsorgane (z. B. Magen, Darm) vorsichtig aus dem Unterleib entfernt, um die Gonaden, die Nieren und die Fortpflanzungsgänge freizulegen. Deutliche morphologische Abnormalitäten der Gonaden sollten notiert werden. Schließlich sollten die Hinterbeine entfernt werden, wenn sie nicht bereits zuvor zum

Sammeln von Blut entfernt wurden. Gesammelte Lebern und der Kadaver mit den Gonaden *in situ* sollte umgehend in die Davidson-Fixierlösung gelegt werden. Das Volumen der Fixierlösung im Gefäß sollte mindestens 10 Mal so viel betragen wie das ungefährte Volumen der Gewebe. Sämtliche Gewebe bleiben mindestens 48 Stunden lang in der Davidson-Fixierlösung, jedoch nicht länger als 96 Stunden, zu welchem Zeitpunkt sie in deionisiertem Wasser ausgespült und in 10 % neutral gepuffertem Formalin gelagert werden (1) (29).

Histopathologie

58. Jede Probenahme bei Jungfröschen wird histologisch für die Pathologie in den Gonaden, den Fortpflanzungsgängen, den Nieren und dem Lebergewebe, d. h. Diagnose und Schweregradeinstufung, bewertet (32). Der Gonadenphänotyp wird ebenfalls aus dieser Bewertung abgeleitet (z. B. Ovarien, Hoden, Intersexualität), und zusammen mit individuellen genetischen Geschlechtmessungen können diese Beobachtungen verwendet werden, um die Phänotypischen/genotypischen Geschlechterverhältnisse zu berechnen.

BERICHTERSTATTUNG

Statistische Analyse

59. Der LAGDA erzeugt drei Arten von Daten, die statistisch analysiert werden müssen: (1) quantitative kontinuierliche Daten (Gewicht, SVL, LSI, VTG), (2) Zeit-bis-zum-Ereignis-Daten für Entwicklungsraten (d. h. Tage bis NF-Stadium 62 von der Test-Einleitung) und (3) ordinale Daten in Form der Schweregrade oder Entwicklungsstadien aus Histopathologieklassifizierungen.
60. Der Testplan und die gewählte Statistikmethode sollten eine ausreichende statistische Aussagekraft besitzen, damit Änderungen von biologischer Bedeutung bei den Endpunkten erkannt werden können, für die eine NOEC oder EC_x anzugeben ist. Statistische Datenanalysen (allgemein auf mittlerer Replikatbasis) sollten nach den Verfahren im Dokument „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ (33) durchgeführt werden. Anlage 7 dieser Prüfmethode bietet den empfohlenen Entscheidungsbaum der statistischen Analyse und Hilfestellungen für die Behandlung der Daten und bei der Wahl des geeignetsten statistischen Tests oder Modells, die im LAGDA verwendet werden sollten.

61. Die Daten aus den Proben der Jungfrösche (z. B. Wachstum, LSI) sollten für jedes genotypische Geschlecht separat analysiert werden, da das genotypische Geschlecht für alle Frösche bestimmt wird.

Erwägungen zur Datenanalyse

Verwendung von kompromittierten Replikaten und Behandlungen

62. Replikate und Behandlungen können aufgrund einer übermäßigen Mortalität aus einer offensichtlichen Toxizität, Erkrankung oder einem technischen Fehler kompromittiert werden. Wenn eine Behandlung aufgrund einer Erkrankung oder eines technischen Fehlers kompromittiert ist, sollten drei nicht kompromittierte Behandlungen mit drei nicht kompromittierten Replikaten für die Analyse verfügbar sein. Wenn bei hohen Behandlungen eine offensichtliche Toxizität auftritt, wird es bevorzugt, dass mindestens drei Behandlungsniveaus mit drei nicht kompromittierten Replikaten für die Analyse zur Verfügung stehen (konsistent mit dem Ansatz der maximal tolerierten Konzentration für OECD-Testrichtlinien (34)). Zusätzlich zur Mortalität können im Qualitätsvergleich mit den Kontrolltieren Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität Auswirkungen auf das Verhalten (z. B. Treiben auf der Oberfläche, Liegen auf dem Beckenboden, umgekehrtes oder unregelmäßiges Schwimmen, mangelndes Auftauchen), morphologische Läsionen (z. B. hämorrhagische Läsionen, Unterleibsödeme) oder die Hemmung normaler Fütterungsreaktionen umfassen.

Lösungsmittelkontrolle

63. Bei Ende des Tests werden die potenziellen Wirkungen des Lösungsmittels (falls vorhanden) bestimmt. Dazu wird ein statistischer Vergleich der Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel und der Kontrollgruppe mit dem Verdünnungswasser vorgenommen. Die wichtigsten Endpunkte für diese Analyse sind Wachstumsdeterminanten (Masse und Länge), da diese Parameter auch durch allgemein wirkende Toxizität beeinträchtigt werden können. Wenn statistisch signifikante Unterschiede in diesen Endpunkten zwischen der Verdünnungswasserkontrolle und den Lösungsmittelkontrollgruppen erkannt werden, sollte das beste fachliche Urteilsvermögen angewandt werden, um zu bestimmen, ob die Validität des Tests kompromittiert ist. Wenn die zwei Kontrollen sich unterscheiden, sollten die den Chemikalien ausgesetzten Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasserkontrolle bevorzugt wird. Wenn es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Kontrollgruppen gibt, wird empfohlen, dass die den Prüfchemikalien ausgesetzten

Behandlungen mit den gepoolten verglichen werden (Lösungsmittel- und Verdünnungswasserkontrollgruppen), außer es ist bekannt, dass der Vergleich mit der Verdünnungswasser- oder der Lösungsmittelkontrollgruppe bevorzugt wird.

Prüfbericht

64. Der Prüfbericht sollte Folgendes enthalten:

Prüfchemikalie:

- Physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;
- 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, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw. (einschließlich des Gehalts an organischem Kohlenstoff, falls zutreffend).

- 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.

Geprüfte Fischart:

- wissenschaftliche Bezeichnung, ggf. Stamm, Herkunft und Art der Sammlung der befruchteten Eier sowie anschließende Handhabung.
- Auftreten von Skoliose in historischen Kontrollen für die verwendete Stammkultur.

Prüfbedingungen:

- Photoperiode(n);

- Testdesign (*z. B.* Kammergröße, Material- und Wasservolumen, Anzahl an Prüfkammern und Replikaten, Anzahl an Prüforganismen pro Replikat);
- Methode zur Herstellung von Stammlösungen und Häufigkeit der Erneuerung (falls verwendet, sind der Lösungsvermittler und seine Konzentration anzugeben);
- Methode zur Dosierung der Prüfchemikalie (*z. B.* Pumpen, Verdünnungssysteme);
- Wiederfindungsrate der Methode und nominelle Prüfkonzentrationen, Bestimmungsgrenze, Mittel der gemessenen Werte mit ihren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden, sowie Nachweise dafür, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in echter Lösung beziehen;
- Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), Gesamtgehalt von Jod, gesamter organischer Kohlenstoff (falls gemessen), Schwebstoffe (falls gemessen), Salzgehalt des Prüfmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;
- die nominalen Prüfkonzentrationen, die Mittelwerte der gemessenen Werte und ihre Standardabweichungen;
- Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße, pH-Wert, Temperatur (täglich) und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;
- ausführliche Angaben zur Fütterung (*z. B.* Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

Ergebnisse:

- Belege dafür, dass die Kontrollen die Validitätskriterien erfüllt haben;
- Die Daten für die Kontrolle (und Lösungsmittelkontrolle, falls verwendet) und die Behandlungsgruppen lauten wie folgt: beobachtete Mortalität und Abnormalität, Zeit bis NF-Stadium 62, Beurteilung der Schilddrüsenhistologie (nur larvale Probenahme), Wachstum (Gewicht und Länge), LSI (nur Probenahme bei Jungtieren), genetische/phänotypische Geschlechtsverhältnisse (nur Probenahme bei Jungtieren), Ergebnisse der Histopathologiebewertung für Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Niere und Leber (nur Probenahme bei Jungtieren) und Plasma-VTG (nur Probenahme bei Jungtieren, wenn durchgeführt);

- Ansatz der statistischen Analyse und Auswertung der Daten (angewandter statistischer Test oder angewandtes Modell);
 - NOEC (No Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung;
 - LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) für jede bewertete Wirkung (bei $\alpha = 0,05$); ECx für jede bewertete Wirkung, falls zutreffend, und Konfidenzintervalle (z. B. 95 %) und ein Diagramm des angepassten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde, die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die Formel des Regressionsmodells, die geschätzten Modellparameter und deren Standardfehler.
 - Abweichungen von der Prüfmethode und Abweichungen von den Akzeptanzkriterien und Erwägungen der potenziellen Folgen hinsichtlich des Testergebnisses.
65. Für die Ergebnisse der Endpunktmessungen sollten die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (auf Replikat- und Konzentrationsbasis, falls möglich) präsentiert werden.
66. Die mediane Zeit zum NF-Stadium 62 bei Kontrollen sollte berechnet und als Mittelwert der Mediane der Replikate und ihrer Standardabweichungen präsentiert werden. Auf die gleiche Weise sollte bei Behandlungen ein Behandlungsmedian berechnet und als Mittelwert der Mediane der Replikate und ihrer Standardabweichungen präsentiert werden.

LITERATURHINWEISE

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD und Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W und Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16–27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I und Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281–285.
- (8) Miyata S, Koike S und Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.
- (9) Mikamo K und Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K und Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.

- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T und Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.
- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S und Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J und Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441–448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR und Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321–327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A und Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Chapter C.4 of this Annex, Ready Biodegradability Test.
- (18) Chapter C.29 of this Annex, Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL und Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for

Economic Cooperation and Development, Paris.

- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ und Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 ff.
- (25) Chapter C.38 of this Annex, Amphibian Metamorphosis Assay.
- (26) Chapter C.48 of this Annex, Fish Short Term Reproduction Assay.
- (27) Chapter C.41 of this Annex, Fish Sexual Development Test.
- (28) Chapter C.49 of this Annex, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Too I O, Touart L, Wolf DC und Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415–424.
- (31) Luna LG und Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197–202.

Anlage 1

DEFINITIONEN

Apikaler Endpunkt: Auslösen einer Wirkung auf Populationsebene.

Chemikalie: Stoff oder Gemisch

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ECx: (Konzentration mit einer Wirkung von x %) Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Prüforganismen zu verzeichnen ist. Eine EC50 beispielsweise ist die Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer eine Wirkung auf einen Endpunkt im Test hat.

dpf: Tage nach der Befruchtung

Durchflussprüfung: Eine Prüfung mit durchgehender Strömung der Testlösungen durch das Prüfsystem während der Expositionsdauer.

HPG-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Die niedrigste geprüfte Konzentration (LOEC) einer Prüfchemikalie, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung beobachten lässt (bei $p < 0,05$). Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde. Anlage 7 bietet Hilfestellungen.

Median Lethal Concentration (LC50): ist die Konzentration einer Prüfchemikalie, die

schätzungsweise auf 50 % der Prüforganismen während der Prüfdauer letal wirkt.

No observed effect concentration (NOEC) ist die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionsztraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 005$) hat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

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

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

VTG: Vitellogenin ist ein Phospholipoglycoprotein-Vorläufer für Eidotterprotein, das in der Regel bei geschlechtlich aktiven weiblichen Tieren aller eierlegenden Arten vorkommt.

Anlage 2**CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS**

Stoff	Höchstkonzen-tration
Partikel	5 mg/l
Gesamtgehalt an organischem 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
Kobalt	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**PRÜFBEDINGUNGEN FÜR LAGDA**

1. Prüfspezies *Xenopus laevis*
2. Testtyp Kontinuierlicher Durchfluss,
3. Wassertemperatur Die nominale Temperatur beträgt 21 °C. Die mittlere Temperatur über die Testdauer hinweg beträgt 21 ± 1 °C (die einzelnen Replikate und die einzelnen Behandlungen sollten sich nicht um mehr als 1,0 °C unterscheiden)
4. Beleuchtungsqualität Leuchtstofflampen (breites Spektrum) 600–2000 lux (Lumen/m²) an der Wasseroberfläche
5. Photoperiode 12 Std. Licht, 12 Std. Dunkelheit
6. Prüflösungsvolumen und Prüfgefäß (Becken) 4–10 l (mindestens 10–15 cm Wassertiefe)
Glas- oder Edelstahlbecken
7. Erneuerung der Prüflösungen Konstant, unter Berücksichtigung der Aufrechterhaltung der biologischen Bedingungen als auch der Exposition durch die Chemikalie (z. B. 5 Tankvolumenerneuerung pro Tag).
8. Alter der Prüforganismen bei Einleitung Nieuwkoop und Faber (NF), Stadium 8–10
9. Anzahl der Organismen pro Replikat 20 Tiere (Embryos)/Becken (Replikat) bei Einleitung der Exposition und 10 Tiere (Jungtiere)/Becken (Replikat) nach NF-Stadium 66 bis zur Beendigung der Exposition
10. Anzahl der Behandlungen Mindestens 4 Prüfchemikalien plus angemessene Kontrolle(n)
11. Anzahl der Replikate pro Behandlung 4 Replikate pro Behandlung für die Prüfchemikalie und 8 Replikate für die Kontrolle(n)
12. Anzahl der Organismen pro Prüfkonzentration Mindestens 80 Tiere pro Behandlung für die Prüfchemikalie und mindestens 160 Replikate für die Kontrolle(n)

13. Verdünnungswasser	Beliebiges vor Ort verfügbares Wasser, bei dem <i>Krallenfrosch-Larven</i> normal wachsen und sich entwickeln (z. B. Quellwasser oder mit Aktivkohle gefiltertes Leitungswasser)
14. Belüftung	Keine erforderlich, aber eine Belüftung der Becken kann erforderlich sein, wenn die Niveaus des gelösten Sauerstoffs unter die empfohlenen Grenzwerte fällt und die Steigerungen des Durchflusses der Prüflösung maximiert werden.
15. Gelöster Sauerstoff der Prüflösung	Gelöster Sauerstoff: $\geq 40\%$ des Luftsauerstoff-Sättigungswerts oder $\geq 3,5 \text{ mg/l}$
16. pH-Wert der Prüflösung	6,5–8,5 (die einzelnen Replikate/Konzentrationen dürfen sich höchstens um 0,5 unterscheiden)
17. Härte und Alkalität der Prüflösung	10–250 mg CaCO ₃ /l
18. Fütterungsregime	(siehe Anlage 4)
19. Expositionsdauer	Von NF-Stadium 8–10 bis zehn Wochen nach der medianen Zeit bis NF-Stadium 62 in Wasser und/oder Lösungsmittelkontrollgruppe (maximal 17 Wochen)
20. Biologische Endpunkte	Mortalität (und abnormale Erscheinungen), Zeit bis zum NF-Stadium 62 (larvale Probe), Bewertung der Schilddrüsenhistologie (larvale Probe), Wachstum (Gewicht und Länge), Leber-somatischer Index (Probenahme bei Jungfischen), genetische/phänotypische Geschlechtsverhältnisse (Probenahme bei Jungfischen), Histopathologie für Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Niere und Leber (Probenahme bei Jungfischen) und Plasma-Vitellogenin (Probenahme bei Jungfischen, optional)
21. Testvaliditätskriterien	Der gelöste Sauerstoff sollte $> 40\%$ des Luftsättigungswerts betragen; die mittlere Temperatur sollte $21 \pm 1^\circ\text{C}$ und die Unterschiede zwischen den einzelnen Replikaten/Konzentrationen sollten $< 1,0^\circ\text{C}$ betragen; der pH-Wert der Prüflösung sollte im Bereich von 6,5 bis 8,5 liegen; die Mortalität in jedem Replikat sollte bei der Kontrolle $\leq 20\%$ betragen und die mittlere Zeit bis zum NF-Stadium 62 sollte bei der Kontrolle ≤ 45 Tage betragen; das mittlere Gewicht der Prüforganismen im NF-Stadium 62 und bei Beendigung des Tests bei den Kontrollen und den Lösungsmittelkontrollen (falls verwendet) sollte $1,0 \pm 0,2$ bzw. $11,5 \pm 3 \text{ g}$ erreichen, es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von $\pm 20\%$ bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden.

Anlage 4**FÜTTERUNGSREGIME**

Es sollte angemerkt werden, dass obwohl dieses Fütterungsregime empfohlen wird, auch Alternativen zulässig sind, sofern die Prüforganismen mit einer angemessenen Rate wachsen und sich entwickeln.

Fütterung der Larven*Vorbereitung für das Larvenfutter*

- A. 1:1 (v/v) Startfutter für Regenbogenforellen: Algae/TetraFin® (oder ähnliches);
 - 1. Startfutter für Regenbogenforellen: 50 g Startfutter für Regenbogenforellen (feines Granulat oder Pulver) und 300 ml geeignetes gefiltertes Wasser 20 Sekunden lang auf einer hohen Mixereinstellung mischen
 - 2. Algae/TetraFin®-Mischung (oder ähnliches): 12 g Spirulina-Algenscheiben und 500 ml gefiltertes Wasser 40 Sekunden lang auf einer hohen Mixereinstellung mischen, 12 g Tetrafin® (oder ähnliches) mit 500 ml gefiltertem Wasser mischen und diese dann kombinieren, um 1 Liter der 12 g/l Spirulina-Algen und 12 g/l Tetrafin® (oder ähnliches) herzustellen
 - 3. Gleiche Mengen des gemischten Startfutters für Regenbogenforellen mit der Algae/TetraFin®-Mischung (oder ähnliches) kombinieren
- B. Salinenkrebse:

15 ml Salinenkrebseier werden in 1 l Salzwasser ausgebrütet (vorbereitet durch Hinzufügen von 20 ml NaCl zu 1 l deionisiertem Wasser). Nachdem sie 24 Stunden lang unter konstanter Beleuchtung bei Raumtemperatur belüftet wurden, können die Salinenkrebse geerntet werden. Die Salinenkrebse dürfen sich 30 Minuten lang schnell ansiedeln, indem die Belüftung unterbrochen wird. Zysten, die zur Oberseite des Kanisters treiben, werden abgeschüttet und entsorgt und die Krebse werden durch geeignete Filter geschüttet und auf 30 ml mit gefiltertem Wasser aufgefüllt.

Fütterungsprotokoll

Tabelle 1 bietet eine Referenz hinsichtlich der Art und der Menge des während der Larvenexpositionsstadien verwendeten Futters. Die Tiere sollten drei Mal täglich Montag bis Freitag und einmal täglich an den Wochenenden gefüttert werden.

Tabelle 1: Fütterungsregime für *X. laevis*-Larven in Durchflussbedingungen

Zeit* (Nach der Befruchtung)	Startfutter für Regenbogenforellen: Algae/TetraFin®(oder ähnliches)		Salinenkrebse	
	Wochentag (drei Mal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)	Wochentag (zweimal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)
Tag 4–14 (in Wochen 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (ab Tag 8 bis 15)	0,5 ml (ab Tag 8 bis 15)
Woche 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (ab Tag 16)	1 ml (ab Tag 16)
Woche 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Woche 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Woche 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Woche 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Woche 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Wochen 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Tag 0 wird definiert als der Tag, an dem die hCG-Injektion vorgenommen wird.

Futterübergang von Larve zu Jungfisch

Wenn die Larven die Metamorphose abgeschlossen haben, erhalten sie die unten erläuterte Jungfischfutterformel. Während dieses Übergangs sollte das Larvenfutter reduziert werden, während das Jungfischfutter gesteigert wird. Dies kann erreicht werden, indem das Larvenfutter proportional reduziert wird, während das Jungfischfutter proportional gesteigert wird, während jede Gruppe der fünf Larven über das NF-Stadium 62 hinauswächst und sich dem Abschluss der Metamorphose in NF-Stadium 66 nähert.

Fütterung der Jungfische

Jungfischfutter

Sobald die Metamorphose abgeschlossen ist (Stadium 66) ändert sich das Fütterungsregime ausschließlich auf Futter für 3/32-Zoll Premium sinkendes Froschfutter (*Xenopus Express™*, FL, USA), oder ähnliches.

Vorbereitung von zerkleinerten Pellets für den Übergang von Larve zu Jungfisch

Die Pellets aus sinkendem Froschfutter werden in einer Kaffeemühle, einem Mixer oder einem Mörser mit Stößel zerkleinert, um die Größe der Pellets ungefähr 1/3 zu reduzieren. Eine zu lange Verarbeitung bringt Pulver hervor, wovon abgeraten wird.

Fütterungsprotokoll

Tabelle 2 bietet eine Referenz hinsichtlich der Art und der Menge des während der jungen und adulten Lebensstadien verwendeten Futters. Die Tiere sollten einmal täglich gefüttert werden. Es sollte angemerkt werden, dass Tiere, die die Metamorphose durchlaufen, weiterhin einen Anteil der Salinenkrebsen erhalten, bis > 95 % der Tiere die Metamorphose abgeschlossen haben.

Die Tiere sollten nicht an dem Tag der Beendigung des Tests gefüttert werden, damit das Futter die Gewichtsmessungen nicht beeinflusst.

Tabelle 2: Fütterungsregime für *X. laevis*-Jungfische in Durchflussbedingungen Es sollte angemerkt werden, dass nicht metamorphosierte Tiere, einschließlich jener, deren Metamorphose durch die chemische Behandlung verzögert wurde, keine unzerkleinerten Pellets essen können.

Zeit (Wochen nach dem medianen Metamorphosdatum)	Volumen der zerkleinerten Pellets (mg pro Fröschen)	Gesamtvolumen der Pellets (mg pro Fröschen)
Während die Tiere die Metamorphose abschließen	25	0
Wochen 0–1	25	28
Wochen 2–3	0	110
Wochen 4–5	0	165
Wochen 6–9	0	220

* Der erste Tag der Woche 0 ist das mediane Metamorphosendatum bei den Kontrolltieren.

Anlage 5

BESTIMMUNG DES GENETISCHEN GESCHLECHTS (GENETISCHE GESCHLECHTSBESTIMMUNG)

Die Methode zur Bestimmung des genetischen Geschlechts für *Xenopus laevis* basiert auf Yoshimoto *et al.*, 2008. Detaillierte Verfahren zur Genotypisierung können bei Bedarf aus dieser Veröffentlichung erhalten werden. Alternative Methoden (z. B. qPCR mit hohem Durchsatz) können angewandt werden, wenn sie als geeignet angesehen werden.

Primer für X. laevis

DM-W-Marker

Vorwärts: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Rückwärts: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positivkontrolle

Vorwärts: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Rückwärts: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA-Aufreinigung

DNA aus Muskel- oder Hautgewebe mithilfe von beispielsweise Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Kat. Nr. 69506) oder einem ähnlichen Produkt gemäß den Anweisungen des Kits reinigen. Die DNA kann mit weniger Puffer aus den Spinsäulen herausgelöst werden, um konzentriertere Proben zu erhalten, wenn dies für PCR als erforderlich erachtet wird. Bitte beachten, dass die DNA nicht ganz stabil ist, also muss eine Kreuzkontaminierung sorgfältig vermieden werden, da sie zu einer falschen Charakterisierung von Männchen als

Weibchen oder umgekehrt führen kann.

PCR

Ein mithilfe von JumpStartTM *Taq* von Sigma erstelltes Probenprotokoll findet sich in **Tabelle 1**.

Tabelle 1: Probenprotokoll mithilfe von JumpStartTM *Taq* von Sigma

Master-Mix	1x (μ l)	[Abschluss]
NFW	11	-
10X Puffer	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,4	200 μ M
Marker für Primer (8 μ M)	0,8	0,3 μ M
Marker rev. Primer (8 μ M)	0,8	0,3 μ M
Kontrolle für Primer (8 μ M)	0,8	0,3 μ M
Kontrolle rev. Primer (8 μ M)	0,8	0,3 μ M
JumpStart TM <i>Taq</i>	0,4	0,05 Einheiten/ μ l
DNA-Vorlage	1,0	~200 pg/ μ l

Hinweis: Wenn Master-Mixes vorbereitet werden, muss eine zusätzliche Menge erzeugt werden, um Verluste beim Pipettieren auszugleichen (Beispiel: 25x sollte für nur 24 Reaktionen verwendet werden).

Reaktion:

Master-Mix 19,0 μ l

Vorlage 1,0 μ l

Gesamt 20,0 μ l

Thermocycler-Profil:

Stufe 1. 94 °C 1 Min.

Stufe 2. 94 °C 30 Sek.

Stufe 3. 60 °C 30 Sek.

Stufe 4. 72 °C 1 Min.

Stufe 5. Zu Stufe 2 gehen. 35 Zyklen

Stufe 6. 72 °C 1 Min.

Stufe 7. 4 °C halten

PCR-Produkte können umgehend in einem Gel durchlaufen oder bei 4 °C gelagert werden.

Agarosegel-Elektrophorese (3 %)(Probenprotokoll)

50X TAE

Tris 24,2 g

Eisessig 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Wasser zu 100 ml hinzufügen

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

3:1 Agarose

3 Teile NuSieveTM GTGTM Agarose

1 Teil Fisher Agarose niedrige Elektrophorese (EEO)

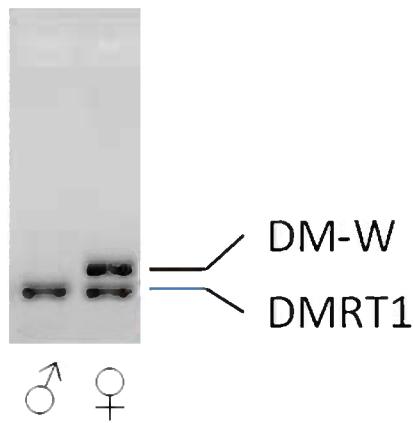
Methode

1. Ein 3 %-Gel herstellen, indem 1,2 g Agarosemischung zu 43 ml 1X TAE hinzugefügt werden. Verwirbeln, um große Klumpen aufzulösen.
2. Die Agarosemischung in der Mikrowelle erhitzen, bis sie sich komplett aufgelöst hat (Überkochen vermeiden). Leicht abkühlen lassen.
3. 1,0 µL Ethidiumbromid hinzufügen (10 mg/ml). Kolben verwirbeln. Bitte beachten, dass Ethidiumbromid mutagen ist, also sollten so weit wie technisch möglich alternative Chemikalien für diesen Schritt verwendet werden, um die Gesundheitsrisiken für die Arbeiter zu minimieren¹.
4. Mit Kamm Gel in die Form gießen. Vollständig abkühlen lassen.
5. Gel zu Apparatur hinzufügen. Gel mit 1X TAE bedecken.
6. 1 µl 6x Ladepuffer zu jeweils 10 µl PCR-Produkt hinzufügen.
7. Mit einer Pipette die Proben in Mulden tropfen.
8. Bei 160 konstanten Volt ~20 Minuten laufen lassen.

Ein Bild des Agarosegels, das die Bandmuster zeigt, die auf männliche und weibliche Tiere hindeuten lassen, ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Abb. 1: Bild des Agarosegels, das das Bandmuster zeigt, das auf ein männliches (♂) Tier (einzelnes Band ~203 bp: DMRT1) und auf ein weibliches (♀) Tier hinweist (zwei Bänder bei ~259 bp: DM-W und 203 bp:DMRT1).

¹ Im Einklang mit Artikel 4 Absatz 1 der Richtlinie 2004/37/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 29 April 2004 über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch Karzinogene oder Mutagene bei der Arbeit (Sechste Einzelrichtlinie im Sinne von Artikel 16 Absatz 1 der Richtlinie 89/391/EWG des Rates) (ABl. L 158 vom 30.4.2004, S. 50).



LITERATURHINWEISE

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

Anlage 6**MESSUNG VON VITELLOGENIN**

Die Messung von Vitellogenin (VTG) wird mithilfe einer Methode namens Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, die ursprünglich für das VTG von Dickkopfälzten entwickelt wurde (Parks *et al.*, 1999). Derzeit gibt es keine im Handel erhältlichen Antikörper für *X. laevis*. Hinsichtlich der Fülle an Informationen für dieses Protein und der Verfügbarkeit von kosteneffektiven handelsüblichen Antikörperproduktionsdiensten ist es jedoch zumutbar, dass Labore einfach ein ELISA entwickeln können, um diese Messung durchzuführen (Olmstead *et al.*, 2009). Außerdem bieten Olmstead *et al.* (2009) eine Beschreibung des Tests und wie er wie unten dargestellt für das VTG in *X. tropicalis* modifiziert wurde. Die Methode nutzt einen Antikörper gegen das VTG von *X. tropicalis*, aber es ist bekannt, dass er auch für das VTG von *X. laevis* wirkt. Es sollte angemerkt werden, dass auch nicht wettbewerbsfähige ELISAs verwendet werden können und dass diese niedrigere Erkennungsgrenzen besitzen könnten als die in der unten beschriebenen Methode.

Material und Reagenzien

- Präadsorbiertes 1. Antikörperserum (Ab)

1 Teil anti-*X. tropicalis* VTG 1. Ab-Serum mit 2 Teilen männlichem Kontrollplasma mischen und bei RT ~ 75 Minuten stehen lassen, 30 Minuten lang mit Eis kühlen, bei > 20K x G 1 Stunde lang bei 4 °C zentrifugieren, Tensid entfernen, aliquotieren, bei -20 °C lagern.

- 2. Antikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP-Konjugat (z. B. Bio-Rad 172–1019)

- VTG-Standard

aufbereitetes VTG von *X. laevis* bei 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin) (z. B. KPL 50-76-00; oder Sigma T0440)
- Normales Ziegenserum (NGS) (z. B. Chemicon® S26-100ml)
- EIA Styropor-Mikrotiterplatten mit 96 Mulden (z. B. ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)

- 37 °C-Hybridisierungsofen (oder schnell ausgleichender Luftinkubator) für Platten, Wasserbad für Röhrchen
- Sonstige gängige Laborausrüstungen, Chemikalien und Materialien.

Rezepte

Beschichtungspuffer (50 mM Karbonatpuffer, pH-Wert 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na₂CO₃ 0,68 g

Wasser 428 ml

10X PBS (0,1 M Phosphat, 1,5 M NaCl):

NaH₂PO₄·H₂O 0,83 g

Na₂HPO₄·7 H₂O 20,1 g

NaCl 71 g

Wasser 810 ml

Waschpuffer (PBST):

10X PBS 100 ml

Wasser 900 ml

pH-Wert auf 7,3 mit 1 M HCl anpassen, dann 0,5 ml Tween-20 hinzufügen

Test-Puffer:

Normales Ziegenserum (NGS) 3,75 ml

640

Waschpuffer 146,25 ml

Probennahme

Blut wird mit einem heparinisierten Mikrohämatokritröhren gesammelt und auf Eis gelegt. Nach einer 3-minütigen Zentrifugierung wird das Röhrchen ausgewertet, aufgebrochen und das Plasma in 0,6 ml-Mikrozentrifugenröhren gegossen, die 0,13 Einheiten lyophilisiertes Aprotinin enthalten. (Diese Röhrchen werden im Voraus vorbereitet, indem die geeignete Menge Aprotinin hinzugefügt wird, sie eingefroren werden und sie in einem Speedvac bei geringer Hitze bis sie trocken sind lyophilisiert werden.) Plasma bei -80 °C lagern, bis es analysiert wurde.

Verfahren für eine Platte

Beschichtung der Platte

20 µl des aufbereiteten VTG mit 22 ml Karbonatpuffer mischen (endgültig 3 µg/ml). 200 µl zu jeder Mulde einer Platte mit 96 Mulden hinzufügen. Die Platte mit Klebesiegelfolie abdecken und über Nacht 2 Stunden lang bei 37 °C (oder 4 °C über Nacht inkubieren lassen).

Blockieren der Platte

Die Blockierungslösung wird hinzugefügt, indem 2 ml des normalen Ziegenserums (NGS) zu 38 ml des Karbonatpuffers hinzugefügt werden. Die Beschichtungslösung entfernen und trocken schütteln. 350 µl der Blockierungslösung in jede Mulde hinzufügen. Mit Klebesiegelfolie abdecken und 2 Stunden lang bei 37 °C inkubieren (oder bei 4 °C über Nacht).

Vorbereitung der Standards

5,8 µl des aufbereiteten VTG-Standards wird mit 1,5 ml des Test-Puffers in einem 12 x 75 mm großen Einweg-Teströhren aus Borosilikatglas gemischt. Dies ergibt 12 760 ng/ml. Dann wird eine serielle Verdünnung vorgenommen, indem 750 µl der vorherigen Verdünnung zu 750 µl des Test-Puffers hinzugefügt werden, um endgültige Konzentrationen von 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 und 50 ng/ml zu erreichen.

Vorbereitung der Proben

Mit einer 1:300- (z. B. 1 µl Plasma mit 299 µl Test-Puffer kombinieren) oder 1:30- Verdünnung von Plasma in Test-Puffer beginnen. Wenn eine große Menge VTG erwartet wird, können zusätzliche oder größere Verdünnungen erforderlich sein. Versuchen, B/B₀ innerhalb des Bereichs der Standards zu halten. Für Proben ohne nennenswertes VTG, z. B. Kontrollmännchen und -weibchen (die allesamt unreif sind), ist die 1:30-Verdünnung zu verwenden. Proben, die weniger verdünnt sind als so, weisen ungewünschte Matrixeffekte auf.

Zusätzlich wird empfohlen, auf jeder Platte eine Positivkontrollprobe durchzuführen. Dies kommt aus einem Pool von Plasma mit höchst induzierten VTG-Niveaus. Der Pool wird ursprünglich in NGS verdünnt, in Aliquote aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Für jede Platte wird ein Aliquot aufgetaut, weiter in Test-Puffer verdünnt und ähnlich wie eine Testprobe durchlaufen.

Inkubation mit 1. Antikörper

Der 1. Ab wird vorbereitet, indem eine 1:2000-Verdünnung des präadsorbierten 1. Ab-Serum in Test-Puffer hergestellt wird (z. B. 8 µl auf 16 ml Test-Puffer). 300 µl der 1. Ab-Lösung mit 300 µl der Probe/des Standards in einem Glasröhrchen kombinieren. Das B₀-Röhrchen wird auf ähnliche Weise mit 300 µl Test-Puffer und 300 µl Antikörper vorbereitet. Zudem sollte ein NSB-Röhrchen mit ausschließlich 600 µl Test-Puffer vorbereitet werden, d. h. ohne Ab. Die Röhrchen mit Parafilm abdecken und vorsichtig schütteln, um sie zu mischen. 1 Stunde lang in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubieren.

Waschen der Platte

Die Platte kurz vor Abschluss der 1. Ab-Inkubation waschen. Dies erfolgt durch Ausschütteln der Inhalte und Trockentupfen auf absorbierendem Papier. Anschließend die Mulden mit 350 µl der Waschlösung füllen, ausschütten und trocken tupfen. Hierfür sind eine Mehrkanal-Repetierpipette oder ein Plattenwäscher nützlich. Der Waschschrift wird weitere zwei Male wiederholt, damit insgesamt drei Mal gewaschen wurde.

Besatz der Platte

Nachdem die Platte gewaschen wurde, die Röhrchen aus dem Wasserbad entfernen und leicht schütteln. 200 µl jedes Proben-, Standard-, B₀- und NSB-Röhrchens hinzufügen, um die Mulden der Platte zu duplizieren. Die Platte mit Klebesiegelfolie abdecken und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubieren lassen.

Inkubation mit dem 2. Antikörper

Am Ende der Inkubation aus dem vorherigen Schritt sollte die Platte drei Mal wie oben beschrieben erneut gewaschen werden. Der verdünnte 2. Ab wird vorbereitet, indem 2,5 µl des 2. Ab mit 50 ml Test-Puffer gemischt werden. 200 µl des verdünnten 2. Ab in jede Mulde hinzufügen, wie oben beschrieben versiegeln und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubieren.

Zusatz von Substrat

Nachdem die Inkubation mit dem 2. Ab abgeschlossen ist, muss die Platte wie zuvor beschrieben drei Mal gewaschen werden. Anschließend 100 µl des TMB-Substrats zu jeder Mulde hinzufügen. Die Reaktion 10 Minuten lang fortschreiten lassen, vorzugsweise abseits von grellem Licht. Die Reaktion anhalten, indem 100 µl 1 M Phosphorsäure hinzugefügt werden. Dadurch ändert sich die Farbe von blau zu einem intensiven Gelb. Die Absorption bei 450 nm mithilfe eines Plattenlesers messen.

B/Bo berechnen

Den durchschnittlichen NSB-Wert von allen Messungen abziehen. Der B/B_o wird für jede Probe und jeden Standard berechnet, indem der Absorptionswert (B) durch die durchschnittliche Absorption der B_o-Probe geteilt wird.

Die Standardkurve ermitteln und unbekannte Mengen festlegen

Mithilfe einer Computergrafiksoftware (z. B. SlidewriteTM oder Sigma Plot[®]) eine Standardkurve erzeugen, die die Menge von B/B_o der Probe auf der Grundlage des B/B_o der Standards extrapoliert. Normalerweise ist die Menge auf einer log-Skala gepunktet und die Kurve hat eine sigmoide Form. Sie erscheint jedoch linear, wenn ein enger Standardbereich verwendet wird. Die Probenmengen für den Verdünnungsfaktor korrigieren und als mg VTG/ml Plasma melden.

Bestimmung der minimalen Erkennungsgrenzen (MDL)

Häufig ist es besonders bei normalen Männchen nicht klar, wie Ergebnisse von niedrigen Werten eingetragen werden sollen. In diesen Fällen sollten die 95 % „Konfidenzgrenzen“ verwendet werden, um zu bestimmen, ob ein Wert als Null oder als andere Zahl eingetragen werden sollte. Wenn das Probenergebnis innerhalb des Konfidenzintervalls des Nullstandards liegt (B_o), sollte das Ergebnis als Null eingetragen werden. Das minimale Erkennungsniveau wird der niedrigste Standard sein, der sich konsistent vom Nullstandard

unterscheidet; dies gilt nur, wenn die zwei Konfidenzintervalle sich nicht überschneiden. Für ein Probenergebnis, das innerhalb der Konfidenzgrenze des minimalen Erkennungsniveaus oder darüber liegt, wird der berechnete Wert eingetragen. Wenn eine Probe zwischen den Nullstandard und die Intervalle des minimalen Erkennungsniveaus fällt, sollte eine Hälfte des minimalen Erkennungsniveaus für den Wert dieser Probe eingetragen werden.

LITERATURHINWEISE

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113–125.

Anlage 7

STATISTISCHE ANALYSE

Der LAGDA erzeugt drei Arten von Daten, die statistisch analysiert werden müssen: (1) Quantitative kontinuierliche Daten, (2) Zeit-bis-zum-Ereignis-Daten für Entwicklungsraten (Zeit bis NF-Stadium 62) und (3) ordinale Daten in Form der Schweregrade oder Entwicklungsstadien aus Histopathologiebewertungen. Der empfohlene Entscheidungsbaum der statistischen Analyse für den LAGDA wird in Abbildung 1 dargestellt. Zudem sind nachfolgend ein paar Anmerkungen aufgeführt, die eventuell zur Durchführung der statistischen Analyse für die Messungen aus dem LAGDA erforderlich sind. Für den Analyseentscheidungsbaum sollten die Ergebnisse der Messungen für Mortalität, Wachstum (Gewicht und Länge) und den lebersomatischen Index (LSI) gemäß dem Zweig „Weitere Endpunkte“ analysiert werden.

Kontinuierliche Daten

Daten für kontinuierliche Endpunkte sollten zuerst auf Monotonie geprüft werden, indem der Rang der Daten geändert, diese in ein ANOVA-Modell eingepasst und die linearen und quadratischen Kontraste verglichen werden. Wenn die Daten monoton sind, sollte eine abstuferende Jonckheere-Terpstra-Trendprüfung an den Medianen der Replikate durchgeführt werden und es sollten keine nachfolgenden Analysen angewandt werden. Eine Alternative zu Daten, die normal mit homogenen Varianzen verteilt werden, ist die abstufernde Williams-Prüfung. Wenn die Daten nicht monoton sind (der quadratische Kontrast ist signifikant und der lineare ist nicht signifikant), sollten sie mithilfe eines ANOVA-Modells mit gemischten Effekten analysiert werden. Die Daten sollten dann auf Normalität (vorzugsweise mithilfe des Shapiro-Wilk- oder Anderson-Darling-Tests) und Varianzhomogenität (vorzugsweise mithilfe des Levene-Tests) beurteilt werden. Beide Tests werden mit den Residuen des ANOVA-Modells mit gemischten Effekten durchgeführt. Anstelle der Durchführung dieser förmlichen Tests auf Normalverteilung und Varianzhomogenität kann auch fachliches Ermessen angewendet werden; Tests sind jedoch zu bevorzugen. Ergibt sich eine Normalverteilung der Daten mit homogener Varianz, werden die Annahmen einer gemischten ANOVA-Wirkung erfüllt und mit dem Dunnett-Test wird eine signifikante Wirkung festgestellt. Wo Nichtnormalität oder Varianzheterogenität festgestellt wird, werden die Annahmen von Dunnett Test verletzt und eine normalisierende, varianzstabilisierende Transformation angestrebt. Wenn keine solche

Transformation gefunden wird, wird ein signifikanter Behandlungseffekt mit einem Dunn-Test bestimmt. Wo möglich sollte ein einseitiger Tests anstatt eines zweiseitigen Tests durchgeführt werden, aber es erfordert eine fachkundige Beurteilung, um zu bestimmen, welche für einen gegebenen Endpunkt angemessen ist.

Mortalität

Die Mortalitätsdaten sollten für den Zeitraum, der den gesamten Test umfasst, analysiert und als Anteil formuliert werden, der in einem bestimmten Becken gestorben ist. Larven, die die Metamorphose nicht innerhalb des vorgegebenen Zeitrahmens abschließen, Larven, die sich in der larvalen Teilstichprobenkohorte befinden, Jungfrösche, die gekeult werden, und Tiere, die aufgrund eines Versuchsfehlers sterben, sollten als zensierte Daten behandelt und nicht in den Nenner der Prozentberechnung mit aufgenommen werden. Vor statistischen Analysen sollten die Mortalitätsanteile in Arcsin-Quadratwurzeln verwandelt werden. Alternativ kann der abstufende Cochran-Armitage-Test verwendet werden, mit einer Rao-Scott-Anpassung, während eine Überdispersion vorhanden ist.

Gewicht und Länge (Wachstumsdaten)

Männchen und Weibchen sind während der Metamorphose nicht sexuell dimorph, also sollten Wachstumsdaten zur larvalen Teilstichprobenahme unabhängig vom Geschlecht analysiert werden. Wachstumsdaten von Jungtieren sollten jedoch auf der Grundlage des genetischen Geschlechts getrennt voneinander analysiert werden. Eine log-Transformation kann für diese Endpunkte erforderlich sein, da die log-Normalität der Größendaten nicht unüblich ist.

Leber-somatischer Index (LSI)

Lebergewichte sollten als Anteile des gesamten Körpergewichts (d. h LSI) normalisiert und getrennt auf der Grundlage des genetischen Geschlechts analysiert werden.

Zeit bis zum NF-Stadium 62

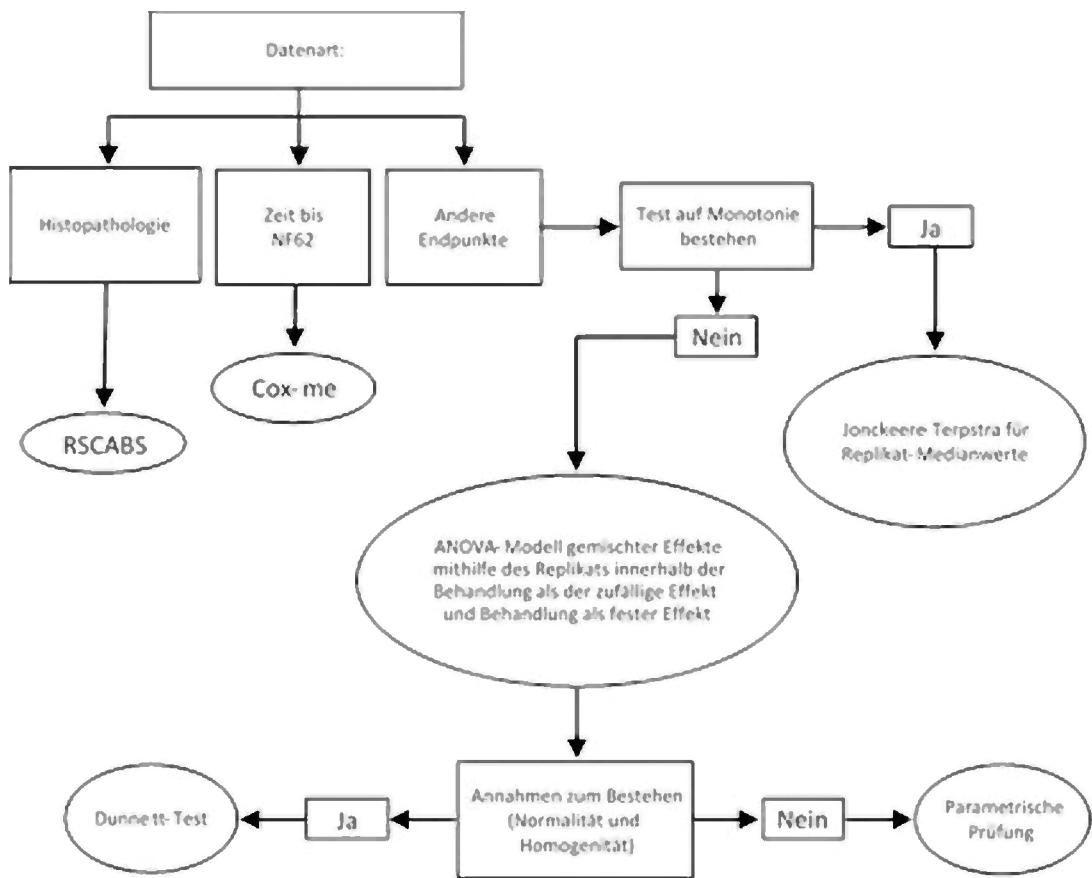
Zeit-zur-Metamorphose-Daten sollten wie Zeit-zum-Ereignis-Daten behandelt werden, wobei Mortalitäten oder Einzeltiere, die innerhalb von 70 Tagen nicht das NF-Stadium 62 erreichen, wie rechtszensierte Daten behandelt werden (d. h. der tatsächliche Wert ist größer als 70 Tage, aber die Studie endet, bevor die Tiere im NF-Stadium 62 in 70 Tagen erreicht hätten). Die mediane Zeit zum NF-Stadium 62, Abschluss der Metamorphose, bei Verdünnungswasserkontrollen sollte verwendet werden, um das Datum des Testendes zu bestimmen. Die mediane Zeit zum Abschluss der Metamorphose könnte anhand der Kaplan-

Meier-Produktgrenzenschätzer bestimmt werden. Dieser Endpunkt sollte mithilfe eines proportionalen Gefahrenmodells nach Cox mit gemischten Effekten analysiert werden, das die Replikatstruktur der Studie berücksichtigt.

Histopathologiedaten (Schweregrade und Entwicklungsstadien)

Histopathologiedaten (Schweregrade und Entwicklungsstadien) Ein Test namens RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage nach Scheiben) nutzt eine abstufende, an Rao-Scott angepasste Cochran-Armitage-Trendprüfung auf jedem Schweregrad in einer histopathologischen Wirkung (Green *et al.*, 2014). Die Rao-Scott-Anpassung integriert das experimentelle Design des Replikatgefäßes im Test. Das Verfahren „nach Scheiben“ nimmt die biologische Erwartung auf, dass die Schwere des Effekts mit steigenden Dosen oder Konzentrationen dazu neigt, höher zu werden, während die individuellen Subjektwerte beibehalten werden und die Schwere jedes gefundenen Effekts enthüllt wird. Das RSCABS-Verfahren bestimmt nicht nur, welche Behandlungen sich statistisch von den Kontrollen unterscheiden (d. h. eine schwerere Pathologie als die Kontrollen haben), sondern legt auch fest, bei welchem Schweregrad die Differenz auftritt, wodurch der Analyse dringend erforderlicher Kontext hinzugefügt wird. Im Falle einer entwicklungstechnischen Stufentrennung der Gonaden und Fortpflanzungsgänge sollten die Daten zusätzlich manipuliert werden, da eine Annahme von RSCABS darin besteht, dass die Schwere des Effekts sich mit der Dosis steigert. Der beobachtete Effekt könnte eine Verzögerung oder Beschleunigung der Entwicklung sein. Deshalb sollten die Daten zur entwicklungstechnischen Stufentrennung wie gemeldet analysiert werden, um eine Beschleunigung der Entwicklung zu erkennen und dann vor einer zweiten Analyse manuell umgekehrt werden, um eine Verzögerung der Entwicklung zu erkennen.

Abb. 1: Entscheidungsbaum der statistischen Analyse für LAGDA-Daten.



LITERATURHINWEISE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108–1116.

Anlage 8

**ERWÄGUNGEN ZUR NACHVERFOLGUNG UND MINIMIERUNG DES AUFTRESENS
VON SKOLIOSE**

Eine idiopathische Skoliose, die sich normalerweise bei *Xenopus laevis*-Larven als „gebogener Schwanz“ manifestiert, kann die morphologischen und verhaltensbedingten Beobachtungen der Prüfpopulationen komplizieren. Es sollten Bemühungen unternommen werden, um das Auftreten von Skoliose im Besatz und unter Testbedingungen zu minimieren oder zu beseitigen. Im endgültigen Test wird empfohlen, dass die Prävalenz der mäßigen und schweren Skoliose weniger als 10 % beträgt, um das Vertrauen zu stärken, dass der Test konzentrationsbezogene Entwicklungseffekte in sonst gesunden Amphibienlarven erkennt.

Bei täglichen Beobachtungen während des endgültigen Tests sollten sowohl das Auftreten (Anzahl der Tiere) und die Schwere der Skoliose, falls vorhanden, dokumentiert werden. Die Art der Abnormalität sollte hinsichtlich der Stelle (z. B. vor oder hinter dem Rumpf) und Richtung der Krümmung (z. B. lateral oder dorsal-nach-ventral) beschrieben werden. Die Schwere kann wie folgt eingestuft werden:

(NR) Nicht bemerkenswert: keine Krümmung vorhanden

(1) Minimal: leichte laterale Krümmung hinter dem Rumpf; nur im Ruhezustand sichtbar

(2) Mäßig: laterale Krümmung hinter dem Rumpf; stets sichtbar, aber schränkt die Bewegung nicht ein

(3) Schwer: laterale Krümmung vor dem Rumpf; ODER Krümmung, die die Bewegung einschränkt; ODER dorsale-nach-ventrale Krümmung

Ein US EPA FIFRA Scientific Advisory Panel (FIFRA SAP 2013) überprüfte die

zusammengefassten Daten für Skoliose in fünfzehn Amphibienmetamorphose-Tests mit *X. laevis* (NF-Stadium 51 bis 60+) und stellte allgemeine Empfehlungen zur Reduzierung der Häufigkeit dieser Abnormalität in Prüfpopulationen bereit. Die Empfehlungen sind relevant für den LAGDA, obwohl dieser Test eine längere Entwicklungszeitleiste umfasst.

Historische Laichleistung

Allgemein sollten gesunde adulte Tiere von hoher Qualität als Brutpaare eingesetzt werden; wenn Brutpaare, die Nachkommen mit Skoliose hervorbringen, beseitigt werden, kann dies das Auftreten eventuell mit der Zeit minimieren. Besonders die Minimierung der Verwendung von wild gefischtem Brutbesatz kann hier von Vorteil sein. Die LAGDA-Expositionsdauer beginnt mit Embryos in NF-Stadium 8 bis 10 und es ist nicht praktikabel, zu Beginn des Tests zu bestimmen, ob die gegebenen Einzeltiere eine Skoliose aufweisen werden oder nicht. Deshalb sollte zusätzlich zur Nachverfolgung des Auftretens von Skoliose in Tieren, die am Test teilnehmen, die historische Legeleistung (einschließlich der Prävalenz von Skoliose in Larven, die sich entwickeln dürfen) dokumentiert werden. Es kann nützlich sein, den Anteil jedes Geleges, das nicht in einer gegebenen Studie verwendet wird, weiter zu überwachen und diese Beobachtungen zu melden (FIFRA SAP 2013).

Wasserqualität

Es ist wichtig, eine ausreichende Wasserqualität im Laborbesatz und während des Tests zu gewährleisten. Zusätzlich zu den Wasserqualitätskriterien, die regelmäßig für Wassertoxizitätsprüfungen bewertet werden, kann es nützlich sein, auf Nährstoffmängel (z. B. Mangel an Vitamin C, Kalzium, Phosphor) oder einen übermäßigen Gehalt an Selen und Kupfer, von denen gemeldet wurde, dass sie bei im Labor aufgezogenen *Rana* sp. und *Xenopus* sp. zu verschiedenen Graden Skoliose hervorrufen, zu überwachen und diese zu korrigieren (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; wie in FIFRA SAP 2013 berichtet). Die Verwendung eines geeigneten Futters (siehe Anlage 4) und eine regelmäßige Beckenreinigung verbessern allgemein die Wasserqualität und die Gesundheit der Testproben.

Futter

Spezifische Empfehlungen für Futter, das sich bei LAGDA als erfolgreich erwies, werden in Anlage 4 aufgeführt. Es wird empfohlen, dass die Futterquellen auf biologische Giftstoffe, Herbizide und andere Pestizide überprüft werden, die bei *X. laevis* oder anderen Wassertieren bekanntermaßen eine Skoliose hervorrufen (Schlenk und Jenkins 2013). Beispielsweise wurde die Exposition gegenüber bestimmten Cholinesterasehemmern bei Fischen (Schultz *et al.* 1985) und Fröschen (Bacchetta *et al.* 2008) mit einer Skoliose

assoziiert.

LITERATURHINWEISE

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara und G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont und R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyronegenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley und J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322–328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski und D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445–453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez und P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314–320.

Schlenk, D. und Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.“