

B.64 KOMBINIERTE SCREENING-PRÜFUNG MIT WIEDERHOLTER VERABREICHUNG ZUR BEWERTUNG DER REPRODUKTIONS-/ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 422 (2016). Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet. Die ursprüngliche Screening-Prüfrichtlinie 422 wurde im Jahr 1996 angenommen. Sie beruhte auf einem Protokoll für eine kombinierte Screening-Prüfung mit wiederholter Verabreichung zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, die in zwei Expertensitzungen im Jahr 1990 in London (1) und im Jahr 1992 in Tokio (2) erörtert wurde.
2. Bei dieser Prüfmethode wird eine Screening-Prüfung zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, die auf Erfahrungen in Mitgliedstaaten aufgrund der Verwendung der ursprünglichen Methode bei in großen Mengen hergestellten Chemikalien und bei Untersuchungen mit Positivkontrollstoffen (3) (4) basiert, mit einer Toxizitätsprüfung mit wiederholter Verabreichung nach der OECD-Prüfrichtlinie 407 (28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagern, Kapitel B.7 dieses Anhangs) kombiniert.
3. Diese Prüfmethode wurde als Folgemaßnahme der 1998 bei der OECD eingeleiteten prioritären Maßnahme zur Änderung bestehender Prüfrichtlinien und zur Entwicklung neuer Prüfrichtlinien für das Screening und die Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren unter Festlegung von für einen endokrinen Disruptor relevanten Endpunkten aktualisiert (5). In diesem Zusammenhang wurde TG 407 (entsprechend Kapitel B.7 in diesem Anhang) im Jahr 2008 durch Parameter verbessert, mit denen eine endokrine Wirkung von Prüfchemikalien nachgewiesen werden kann. Ziel der Aktualisierung von TG 422 war die Einbeziehung einiger für endokrine Disruptoren relevanter Endpunkte in Screening-TGs, bei denen die Expositionszeiträume einige der empfindlichsten Entwicklungszeiträume (Zeiträume vor oder kurz nach der Geburt) beinhalten.
4. Die ausgewählten für endokrine Disruptoren relevanten zusätzlichen Endpunkte, die Bestandteil auch von TG 443 (Erweiterte Eingenerationen-Prüfung auf Reproduktionstoxizität, entsprechend Kapitel B.56 dieses Anhangs) sind, wurden auf der Grundlage einer Machbarkeitsstudie zur Untersuchung wissenschaftlicher und technischer Fragen im Zusammenhang mit deren Berücksichtigung sowie mit möglichen Anpassungen des für deren Einbeziehung erforderlichen Prüfprotokolls in TG 422 aufgenommen (6).
5. Mit dieser Prüfmethode sollen begrenzte Informationen über die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) ermittelt werden. Sie ist nicht als alternative Prüfmethode und auch nicht als Ersatz für die bereits existierenden Prüfmethode B.31, B.34, B.35 und B.56 zu betrachten.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

6. Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale einer Prüfchemikalie kann die orale Toxizität nach wiederholter Verabreichung des Stoffs bestimmt werden, nachdem zunächst durch Prüfungen auf akute Wirkungen die ersten Toxizitätsdaten gewonnen wurden. Diese Prüfung gibt Aufschluss über mögliche Gesundheitsgefahren infolge wiederholter Exposition über einen begrenzten Zeitraum. Die Methode umfasst die Basisstudie zur Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung, die für chemische Stoffe, bei denen eine 90-Tage-Studie nicht gerechtfertigt ist (z. B. wenn das Produktionsvolumen bestimmte Grenzen nicht überschreitet), oder als Vorstudie zu einer Langzeitstudie verwendet werden kann. Bei der Prüfung sollten die im „OECD Guidance No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation“ (7) genannten Grundsätze und Erwägungen beachtet werden.
7. Außerdem beinhaltet die Prüfung eine Screening-Prüfung auf Reproduktions-/Entwicklungstoxizität und kann daher auch durchgeführt werden, um ersten Aufschluss über mögliche Wirkungen auf die Reproduktionsleistung männlicher und weiblicher Tiere (Funktion der Keimdrüsen, Paarungsverhalten, Empfängnis, Entwicklung des Conceptus, Geburt usw.) entweder bereits früh bei der Bewertung toxikologischer Eigenschaften von Prüfchemikalien oder bei Besorgnis erregenden Prüfchemikalien zu erhalten. Diese Prüfmethode liefert keine umfassenden Informationen über sämtliche Reproduktions- und Entwicklungsaspekte. Insbesondere bietet sie nur beschränkte Möglichkeiten zur Erkennung postnataler Ausprägungen einer pränatalen Exposition oder zur Feststellung von Wirkungen, die bei postnataler Exposition induziert werden können. Aufgrund (unter anderem) der Selektivität der Endpunkte und der kurzen Dauer der Studie werden mit dieser Methode keine Nachweise dafür erlangt, dass keine reproduktions-/entwicklungstoxische Wirkungen eintreten. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse zudem hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können bei Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen berücksichtigt werden.

8. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (8) zu interpretieren. Dieser Conceptual Framework enthält die verbesserte OECD TG 422 in Niveau 4 als *In-vivo*-Prüfung zur Erlangung von Daten über negative Wirkungen auf endokrin relevante Endpunkte. Ein endokrin relevantes Signal kann jedoch nicht an sich als hinreichender Beleg dafür betrachtet werden, dass die betreffende Prüfchemikalie als endokriner Disruptor wirkt.
9. Auch bei dieser Prüfmethode wird das Hauptaugenmerk auf neurologische Wirkungen als spezifischer Endpunkt gelegt; außerdem ist die Notwendigkeit einer sorgfältigen klinischen Beobachtung der Tiere zu betonen, um möglichst umfangreiche Daten zu erfassen. Die Methode sollte chemische Stoffe mit neurotoxischem Potenzial aufspüren, die dann gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung dieses Aspektes erfordern. Außerdem kann die Methode grundlegenden Aufschluss über immunologische Wirkungen ergeben.
10. Wenn keine Daten aus anderen Prüfungen zur Bewertung der systemischen Toxizität, der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität, der Neurotoxizität und/oder der Immunotoxizität vorliegen, sind positive Ergebnisse hilfreich für eine erste Gefährdungsabschätzung und können bei Entscheidungen über die Notwendigkeit und die zeitliche Gestaltung weiterer Prüfungen berücksichtigt werden. Die Prüfung kann insbesondere als Bestandteil des SIDS-Dossiers (Screening Information Data Set) der OECD für die Bewertung existierender Chemikalien hilfreich sein, für die nur wenig oder keinerlei toxikologische Informationen verfügbar sind; außerdem kann sie anstelle zweier getrennter Prüfungen zur Bewertung der Toxizität bei wiederholter Verabreichung (OECD TG 407, entsprechend Kapitel B.7 dieses Anhangs) bzw. der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (OECD TG 421, entsprechend Kapitel B.63 dieses Anhangs) durchgeführt werden. Ferner kann sie als Dosisfindungsstudie für umfassendere Untersuchungen der Reproduktions- und Entwicklungstoxizität dienen sowie dann durchgeführt werden, wenn sie aus sonstigen Gründen als relevant betrachtet wird.
11. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sind. Dosierungen, die sowohl zur Bewertung der allgemeinen systemischen Toxizität als auch der spezifischen Reproduktions-/Entwicklungstoxizität geeignet sind, sind daher mit dieser kombinierten Prüfung u. U. schwieriger zu ermitteln als mit einzelnen Prüfungen, die getrennt durchgeführt werden. Außerdem kann die Auswertung der Prüfergebnisse hinsichtlich der allgemeinen systemischen Toxizität schwieriger sein als bei Durchführung einer getrennten Prüfung mit wiederholter Verabreichung, insbesondere wenn in der Prüfung nicht gleichzeitig serumbezogene und histopathologische Parameter bewertet werden. In Anbetracht dieser technischen Schwierigkeiten erfordert die Durchführung dieser kombinierten Screening-Prüfung beträchtliche Erfahrung mit Toxizitätsprüfungen. Abgesehen von der geringeren Anzahl benötigter Prüftiere kann mit der kombinierten Prüfung allerdings möglicherweise besser zwischen direkten reproduktions-/entwicklungsbezogenen Wirkungen und Wirkungen unterschieden werden, die als sekundäre Wirkungen anderer (systemischer) Wirkungen zu betrachten sind.
12. Bei dieser Prüfung ist der Verabreichungszeitraum länger als bei einer herkömmlichen 28-Tage-Prüfung mit wiederholter Verabreichung. Allerdings werden von jedem Geschlecht pro Gruppe weniger Tiere verwendet als dann, wenn eine herkömmliche 28-Tage-Prüfung mit wiederholter Verabreichung zusätzlich zu einer Screening-Prüfung auf Reproduktions-/Entwicklungstoxizität durchgeführt wird.
13. Bei dieser Prüfmethode wird angenommen, dass die Prüfchemikalie oral verabreicht wird. Bei anderen Expositionswegen können Änderungen erforderlich sein.
14. Bevor die Prüfmethode an einem Gemisch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.
15. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

16. Die Prüfchemikalie wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männlichen Tieren sollte die Prüfchemikalie mindestens vier Wochen bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich) verabreicht werden. (Dieser Zeitraum umfasst mindestens zwei Wochen vor der Paarung, die Paarungszeit und etwa zwei Wochen nach der Paarung). Wegen des begrenzten Verabreichungszeitraums vor der Paarung ist die Fruchtbarkeit bei männlichen Tieren möglicherweise kein besonders empfindlicher Indikator für eine

testikuläre Toxizität. Daher ist eine eingehende histologische Untersuchung der Hoden von wesentlicher Bedeutung. Die Kombination eines Verabreichungszeitraums von zwei Wochen vor der Paarung mit anschließenden Beobachtungen des Paarungsverhaltens und der Fertilität mit einem Verabreichungszeitraum von insgesamt mindestens vier Wochen und einer anschließenden detaillierten Histopathologie der männlichen Keimdrüsen wird als ausreichend für den Nachweis der meisten Wirkungen auf die männliche Fruchtbarkeit und die Spermatogenese betrachtet.

17. Weiblichen Tieren sollte die Prüfchemikalie während der gesamten Dauer der Studie verabreicht werden. Dazu zählen zwei Wochen vor der Paarung (damit mindestens zwei vollständige Östruszyklen erfasst werden), die variable Zeit bis zur Empfängnis und die Dauer der Gravidität sowie mindestens 13 Tage nach der Geburt bis zum Tag vor der vorgesehenen Tötung (einschließlich).
18. Die Dauer der Studie nach der Eingewöhnung und einer Bewertung des Östruszyklus vor der Verabreichung der Prüfchemikalie hängt von der Leistungsfähigkeit des weiblichen Tiers ab; im Allgemeinen beträgt sie etwa 63 Tage [mindestens 14 Tage vor der Paarung, (bis zu) 14 Tage Paarungszeit, 22 Tage Gravidität, 13 Tage Laktation].
19. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziiert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziiert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Auswahl von Versuchstierarten

20. Diese Prüfmethode ist für die Verwendung von Ratten vorgesehen. Wenn die in dieser TG 422 genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren mit TG 407 wurde nur die Ratte als Versuchstier verwendet. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Es sind gesunde jungfräuliche Tiere zu verwenden, die zuvor nicht in anderen Versuchen eingesetzt wurden. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und Alter zu beschreiben. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und $\pm 20\%$ des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie zu einer Langzeitstudie oder einer Eingenerationsstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

Haltung und Fütterung

21. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Versuchsterraum sollte $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30% betragen und – außer beim Reinigen des Raums – 70% nicht überschreiten. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfchemikalie sichergestellt werden muss, wenn die Prüfchemikalie auf diesem Weg verabreicht werden soll.
22. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Trächtigen weiblichen Tieren sollte in Einzelhaltung Material für den Nestbau bereitgestellt werden. Säugende weibliche Tiere werden in Käfigen einzeln mit ihren Nachkommen gehalten.
23. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

Vorbereitung der Versuchstiere

24. Gesunde junge adulte Tiere werden randomisiert und in Behandlungsgruppen und auf Käfige verteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige standortbedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Studie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

Vorbereitung der Dosierung

25. Die Prüfchemikalie sollte oral verabreicht werden, wenn nicht andere Verabreichungswege als besser geeignet erscheinen. Auf oralem Weg wird die Prüfchemikalie gewöhnlich mit einer Sonde verabreicht. Alternativ können Prüfchemikalien aber auch über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden.

26. Bei Bedarf wird der Prüfstoff in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Suspension in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei nicht wässrigen Vehikeln müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität und die Homogenität der Prüfchemikalie in dem Vehikel sind zu bestimmen.

VERFAHREN

Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere

27. Jede Gruppe sollte mit mindestens 10 männlichen und 12-13 weiblichen Tieren begonnen werden. Bei den weiblichen Tieren wird vor der Exposition der Östruszyklus untersucht, und Tiere, bei denen nicht der typische Zyklus von 4-5 Tagen festzustellen ist, werden nicht in die Studie einbezogen. Daher wird die Vorhaltung weiterer weiblicher Tiere empfohlen, damit pro Gruppe tatsächlich 10 weibliche Tiere verfügbar sind. Außer bei ausgeprägten toxischen Wirkungen dürften dann pro Gruppe mindestens 8 Graviditäten entstehen; dies ist gewöhnlich die erforderliche Mindestzahl an trächtigen Tieren pro Gruppe. So soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfchemikalie in Bezug auf die Fertilität, die Gravidität, das Verhalten des Muttertiers, das Säugen, das Wachstum und die Entwicklung der F₁-Generation von der Empfängnis bis zu Tag 13 nach der Geburt vornehmen zu können. Sollen Tiere bereits im Verlauf der Prüfung getötet werden, ist die Anzahl der Tiere um die Zahl der Tiere zu erhöhen, die noch vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Zur Beobachtung der Reversibilität, der Persistenz oder des verzögerten Auftretens systemischer toxischer Wirkungen für mindestens 14 Tage nach der Behandlung ist die Einbeziehung einer zusätzlichen Satellitengruppe von fünf Tieren je Geschlecht in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit der höchsten Dosis in Betracht zu ziehen. Tiere der Satellitengruppen werden nicht verpaart und daher auch nicht für die Bewertung der Reproduktions-/Entwicklungstoxizität berücksichtigt.

Dosierung

28. Im Allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Liegen keine geeigneten allgemeinen Toxizitätsdaten vor, kann eine Dosisfindungsstudie (Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft) durchgeführt werden, um die zu verwendenden Dosen zu bestimmen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfchemikalie sollten die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird der Prüfstoff mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen erhalten.
29. Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass trächtige und nicht trächtige Tiere unterschiedlich empfindlich sein können. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder offensichtliches Leiden hervorgerufen werden. Anschließend sollte eine absteigende Folge von Dosisstufen gewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen nachzuweisen. Häufig sind zwei bis vier Intervalle optimal, und die Ergänzung durch eine vierte Versuchsgruppe ist häufig der Anwendung sehr langer Intervalle (z. B. größer als Faktor 10) zwischen den Verabreichungen vorzuziehen.
30. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen darstellen (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung), sind die beobachteten Wirkungen auf endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu bewerten.

Limit-Prüfung

31. Verursacht die Prüfung unter oraler Verabreichung einer Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag bzw. eine entsprechende Konzentration im Futter (je nach Körpergewicht) unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen, und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit mehreren Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Die Limit-Prüfung kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird die maximal erzielbare Exposition in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalien bestimmt.

Verabreichung der Dosen

32. Den Tieren wird die Prüfchemikalie für die Dauer einer Woche (7 Tage) täglich verabreicht. Wird der Prüfstoff über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht

überschreiten, bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml/100 g Körpergewicht in Betracht gezogen werden. Außer bei reizenden oder ätzenden Prüfchemikalien, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.

33. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Prüfchemikalien ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfchemikalie die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfchemikalie im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise sollte angegeben werden. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Wird die kombinierte Prüfung als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Prüfungen die gleiche Nahrung verabreicht werden.

Versuchsplan

34. Die Verabreichung sollte für beide Geschlechter mindestens 2 Wochen vor der Paarung beginnen, nachdem sich die Tiere mindestens 5 Tage lang eingewöhnt haben und nachdem die weiblichen Tiere auf einen normalen Östruszyklus (in einem 2-wöchigen Zeitraum vor der Behandlung) untersucht wurden. Die Studie sollte so geplant werden, dass mit der Bewertung des Östruszyklus bald nach Erreichen der vollständigen Geschlechtsreife begonnen wird. Der Beginn dieser Zeiträume kann je nach Rattenstämmen in den einzelnen Labors leicht variieren und beispielsweise bei Sprague-Dawley-Ratten bei einem Alter von 10 Wochen und bei Wistar-Ratten etwa bei einem Alter von 12 Wochen liegen. Muttertiere sollten an Tag 13 nach der Geburt oder kurz darauf getötet werden. Um eine nächtliche Futterkarenz der Muttertiere vor der Blutentnahme (wenn diese Option bevorzugt wird) zu ermöglichen, müssen Muttertiere und ihre Nachkommen nicht unbedingt am selben Tag getötet werden. Der Tag der Geburt (d. h. der Tag, an dem der Geburtsvorgang abgeschlossen wurde) wird als Tag 0 nach der Geburt bezeichnet. Weibliche Tiere, bei denen keine Besamung festzustellen ist, werden 24-26 Tage nach dem letzten Tag der Paarungszeit getötet. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der Paarungszeit fortgesetzt. Männliche Tiere werden auch nach der Paarungszeit noch mindestens über den vollständigen Verabreichungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Anschließend werden sie getötet oder alternativ weiter gehalten und behandelt, damit eine zweite Paarung erfolgen kann, wenn dies als angemessen betrachtet wird.
35. Die tägliche Behandlung der weiblichen Muttertiere sollte während der Gravidität sowie mindestens bis zu Tag 13 nach der Geburt bzw. zum Tag vor der Tötung (einschließlich) fortgesetzt werden. Bei Studien, bei denen die Prüfchemikalie durch Inhalation oder dermal verabreicht wird, sollte die Verabreichung mindestens bis zu Tag 19 der Trächtigkeit (einschließlich) fortgesetzt und so bald wie möglich (spätestens an Tag 4 nach der Geburt (PND 4)) wieder aufgenommen werden.
36. Tiere in einer Satellitengruppe, bei denen Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, (wenn überhaupt berücksichtigt) werden nicht verpaart. Sie sollten für mindestens weitere 14 Tage nach der ersten vorgesehenen Tötung von Muttertieren ohne Behandlung gehalten werden, um ein verzögertes Auftreten, die Persistenz oder die Reversibilität toxischer Wirkungen festzustellen.
37. Der Versuchsplan ist in Anlage 2 in einem Diagramm dargestellt.

Östruszyklen

38. Östruszyklen sollten vor Beginn der Behandlung überwacht werden, damit für die Studie weibliche Tiere mit regelmäßigem Zyklus ausgewählt werden können (Nummer 27). Außerdem sollten ab Beginn des Behandlungszeitraums bis zu Anzeichen für eine Besamung täglich vaginalabstriche untersucht werden. Wenn Bedenken hinsichtlich akuter Auswirkungen von Stress bestehen, die bei Beginn der Verabreichung die Östruszyklen verändern könnten, können die Versuchstiere in den Labors zwei Wochen behandelt werden, um anschließend die Östruszyklen vor der Paarungszeit über mindestens zwei Wochen und anschließend bis zu Anzeichen für eine Besamung in der Paarungszeit anhand täglicher vaginalabstriche zu überwachen. Bei der Entnahme vaginaler/zervikaler Zellen ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Schleimhaut nicht gereizt wird, damit es nicht zu Pseudograviditäten kommt (8) (9).

Verpaarung

39. In der Regel sollten bei dieser Studie männliche und weibliche Tiere im Verhältnis 1:1 (ein männliches auf ein weibliches Tier) eingesetzt werden. Ausnahmen können sich gelegentlich ergeben, wenn männliche Tiere sterben. Das weibliche Tier sollte mit demselben männlichen Tier gehalten werden, bis Anzeichen für eine Paarung festgestellt werden bzw. bis zwei Wochen vergangen sind. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder vaginalpfröpfe untersucht. Tag 0 der Trächtigkeit ist der Tag, an dem die Besamung (durch vaginalpfropf oder Spermaspuren) nachgewiesen werden kann. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung weiblicher Tiere mit bewährten männlichen Tieren der gleichen Gruppe erwogen werden.

Wurfgröße

40. Am PND 4 kann die Größe eines jeden Wurfs angepasst werden, indem überschüssige Jungtiere nach dem Zufallsprinzip aussortiert werden, um je nach normalem Umfang eines Wurfs beim verwendeten Rattenstamm pro Wurf nach Möglichkeit vier oder fünf Jungtiere pro Geschlecht und Wurf zu erhalten. Von zwei der überschüssigen Jungtiere sollten Blutproben entnommen, in Pools zusammengefasst und zur Bestimmung von Serumspiegeln (T4) verwendet werden. Die selektive Eliminierung von Jungtieren, z. B. auf der Grundlage des Körpergewichts oder des anogenitalen Abstands (AGD), wird nicht empfohlen. Wenn es wegen der Anzahl männlicher bzw. weiblicher Jungtiere nicht möglich ist, pro Wurf jeweils vier oder fünf Jungtiere eines jeden Geschlechts zu erhalten, ist auch eine grobe Anpassung (beispielsweise sechs männliche und vier weibliche Tiere) akzeptabel. Wenn die Anzahl der Tiere eines Wurfs die Eliminierungsgrenze (8 oder 10 Jungtiere pro Wurf) unterschreitet, werden keine Jungtiere aussortiert. Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der Eliminierungsgrenze liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.
41. Wenn die Größe des Wurfs nicht geändert wird, werden an Tag 4 nach der Geburt zwei Jungtiere pro Wurf human getötet und Blutproben zur Bestimmung der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum entnommen. Nach Möglichkeit sollten diese zwei Jungtiere je Wurf zwei weibliche Jungtiere sein, damit männliche Jungtiere zur Prüfung der Brustwarzenretention aufgespart werden können, es sei denn, dass nach dem Aussortieren dieser Jungtiere keine weiblichen Tiere zur abschließenden Bewertung mehr verbleiben würden. Es werden keine Jungtiere aussortiert, wenn die Größe des Wurfs dadurch auf weniger als 8 bzw. 10 Jungtiere sinkt (je nach Größe eines normalen Wurfs beim betreffenden Rattenstamm). Wenn die Anzahl der Jungtiere um nur ein Tier über der normalen Größe eines Wurfs liegt, wird nur ein Jungtier aussortiert und zur Blutentnahme für mögliche Bewertungen der Serumspiegel (T4) verwendet.

Beobachtungen

42. Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise jeweils zur gleichen Zeit, und unter Berücksichtigung des voraussichtlichen Zeitraums nach der Verabreichung vorgenommen werden, in welchem der Wirkungsgipfel zu erwarten ist. Der Gesundheitszustand der Tiere ist zu dokumentieren. Mindestens zweimal täglich erfolgt eine Beobachtung aller Tiere auf Erkrankungen oder Todesfälle.
43. Bei allen Muttertieren sollte einmal vor der Exposition (um intraindividuelle Vergleiche zu ermöglichen) und danach mindestens einmal wöchentlich eine eingehende klinische Untersuchung erfolgen. Die Beobachtungen sind außerhalb des Käfigs, in dem die Tiere gehalten werden, in stets gleicher Umgebung und vorzugsweise stets zur gleichen Zeit täglich vorzunehmen. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Durch geeignete Maßnahmen ist sicherzustellen, dass die Prüfbedingungen möglichst konstant bleiben und dass die Beobachtungen vorzugsweise durch Untersucher erfolgen, denen die Behandlung der Tiere nicht bekannt ist. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete und auf autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Piloerektion, Pupillengröße, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf die Behandlung der Tiere sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen), schwere oder verzögerte Geburt oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten ebenfalls dokumentiert werden (10).
44. Einmal während der Untersuchung sollte bei fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die zufällig aus den Gruppen ausgewählt wurden, die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (8) (9) (11), die Greifkraft (12) und die motorische Aktivität (13) bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden. Bei männlichen Tieren sollten diese funktionellen Beobachtungen gegen Ende des Verabreichungszeitraums kurz vor der vorgesehenen Tötung und in jedem Fall vor der Blutentnahme zur hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchung erfolgen (Nummern 53-56 einschließlich Fußnote 1). Weibliche Tiere sollten sich bei diesen Funktionsprüfungen in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden und vorzugsweise einmal in der letzten Woche der Laktation (z. B. LD 6-13) kurz vor der vorgesehenen Tötung untersucht werden. Die Zeiträume der Trennung von Muttertieren und Jungtieren sollten möglichst kurz sein.
45. Die einmalig gegen Ende der Untersuchung vorgenommenen funktionellen Beobachtungen können bei Vorstudien für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität (90 Tage) und bei Langzeitstudien entfallen. In diesem Fall sollten die funktionellen Beobachtungen im Rahmen dieser Folgestudie vorgenommen werden. Andererseits könnten die Daten über funktionelle Beobachtungen aus der Untersuchung mit wiederholter Verabreichung aber die Wahl der Dosisstufen für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische oder langfristige Toxizität erleichtern.
46. In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätsanzeichen aufweisen, dass die Leistungen in Funktionsprüfungen dadurch signifikant beeinträchtigt würden.
47. Die Trächtigkeitsdauer wird von Tag 0 der Gravidität an berechnet und sollte vermerkt werden. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Totgeburten, Lebendgeburten und Kümmerlinge (Jungtiere, die erheblich kleiner sind als Jungtiere einer vergleichbaren Kontrollgruppe) sowie auffallende Anomalien feststellen zu können.
48. Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt sollten lebende Jungtiere gezählt und nach Geschlechtern unterschieden und die Würfe jeweils gewogen werden. Zusätzlich zu den Beobachtungen bei Elterntieren (Nummern 43 und 44) sollte ungewöhnliches Verhalten der Nachkommen dokumentiert werden.

49. Der anogenitale Abstand (AGD) sollte bei jedem Jungtier zwischen PND 0 und PND 4 am selben Tag gemessen werden. Das Körpergewicht des Jungtiers wird am Tag der Messung des AGD erfasst, der auf Jungtiergröße — vorzugsweise die Quadratwurzel des Körpergewichts — genormt sein sollte (14). Die Anzahl der Brustwarzen/Warzenhöfe bei männlichen Jungtieren ist wie in OECD GD 151 empfohlen an PND 12 oder 13 zu kontrollieren (15).

Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch

50. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend mindestens in wöchentlichen Abständen sowie bei Versuchsende gewogen werden. Während der Gravidität sollten weibliche Tiere an den Tagen 0, 7, 14 und 20 sowie innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Tag 0 oder Tag 1 nach der Geburt) und mindestens an den Tagen 4 und 13 nach der Geburt gewogen werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren.
51. Vor der Paarung, vor der Gravidität und vor der Laktation sollte die Futterraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Messung der Futterraufnahme während der Paarungszeit ist fakultativ. Wenn die Prüfchemikalie mit dem Trinkwasser verabreicht wird, sollte in diesen Zeiträumen auch die Wasseraufnahme gemessen werden.

Hämatologie

52. Bei fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die aus jeder Gruppe zufällig ausgewählt wurden, sollten während der Untersuchung einmal die folgenden hämatologischen Parameter bestimmt werden: Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Retikulozyten, Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Blutgerinnungszeit/-fähigkeit. Wenn die Prüfchemikalie oder ihre möglichen Metaboliten oxidierende Eigenschaften haben oder diese vermutet werden, sollten zusätzlich die Methämoglobinkonzentration und die Heinz-Körper bestimmt werden.
53. Blutproben sollten an einer benannten Stelle entnommen werden. Die weiblichen Tiere sollten sich bei der Entnahme der Proben in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden. Um bei der praktischen Handhabung Schwierigkeiten aufgrund des unterschiedlichen Beginns der Trächtigkeit zu vermeiden, kann die Blutentnahme bei weiblichen Tieren alternativ zur Probenahme unmittelbar vor dem Verfahren zur humanen Tötung der Tiere bzw. im Rahmen des Verfahrens ausschließlich am Ende des Zeitraums vor der Paarung erfolgen. Bei männlichen Tieren sollten die Blutproben vorzugsweise unmittelbar vor dem Verfahren zur humanen Tötung der Tiere bzw. im Rahmen des Verfahrens entnommen werden. Alternativ kann die Blutentnahme bei männlichen Tieren auch am Ende des Zeitraums vor der Paarung erfolgen, wenn dieser Zeitpunkt auch für die weiblichen Tiere angenommen wurde.
54. Die Blutproben sind unter geeigneten Bedingungen zu lagern.

Klinisch-biochemische Untersuchungen

55. Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von den ausgewählten fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren je Gruppe entnommen werden. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden. ⁽¹⁾ Die Plasma- oder Serumuntersuchungen sollten die Parameter Natrium, Kalium, Glucose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin, mindestens zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen schließen lassen, (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase und Sorbitolhydrogenase) sowie Gallensäuren umfassen. Die Bestimmung weiterer Enzyme (aus der Leber oder anderen Organen) sowie von Bilirubin kann unter bestimmten Umständen ebenfalls wertvolle Hinweise liefern.
56. Nach dem folgenden Plan werden Blutproben an einer vorgegebenen Stelle entnommen:
- von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf an Tag 4 nach der Geburt, wenn die Anzahl der Jungtiere dies zulässt (Nummern 40 und 41),
 - von allen Muttertieren und von mindestens zwei Jungtieren pro Wurf bei Beendigung des Versuchs an Tag 13 und
 - von allen adulten männlichen Tieren bei Beendigung des Versuchs.

Alle Blutproben werden unter geeigneten Bedingungen gelagert. Bei Blutproben der Jungtiere von Tag 13 sowie bei Blutproben der adulten männlichen Tiere werden die Serumspiegel auf Schilddrüsenhormone (T4) untersucht. Wenn relevant, wird außerdem eine Bewertung von T4 bei Blutproben der Muttertiere sowie bei Jungtieren an Tag 4 vorgenommen. Ebenfalls wenn relevant können auch weitere Hormone gemessen werden. Das Blut der Jungtiere kann zur Analyse der Schilddrüsenhormone nach Würfen zu Pools zusammengefasst werden. Die Schilddrüsenhormone (T4 und TSH) sollten vorzugsweise „insgesamt“ gemessen werden.

⁽¹⁾ Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glucose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, dass die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren könnte. Andererseits jedoch kann die nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Stoffwechsel der (trächtigen) Tiere beeinflussen, die Laktation und die Brutpflege sowie, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegenüber der Prüfchemikalie beeinträchtigen. Wenn die nächtliche Futterkarenz gewählt wird, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen bei den männlichen Tieren in Woche 4 der Studie bestimmt werden. Die weiblichen Tiere sollten nach der Trennung von den Jungtieren (z. B. an PND 13) noch einen weiteren Tag gehalten werden. Muttertiere sollten ab Laktationstag 13-14 über Nacht kein Futter mehr erhalten, und für die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter sollten vor der Tötung entnommene Blutproben verwendet werden.

57. Optional können in der letzten Woche der Studie am Urin, der zu festgelegten Zeiten gesammelt wird, bei fünf zufällig ausgewählten männlichen Tieren je Gruppe folgende Parameter untersucht werden: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Eiweiß, Glucose und Blut/Blutzellen.
58. Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebeschädigung erwogen werden. Des Weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfchemikalie im Verdacht stehen, die entsprechenden Stoffwechselprofile zu beeinflussen, die Parameter Calcium, Phosphat, Nüchtern-Triglyzeride und -Glucose, spezifische Hormone, Methämoglobin und Cholinesterase bestimmt werden. Die Bestimmung muss auf Einzelfallbasis erfolgen.
59. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:
 - der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,
 - Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,
 - Testkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.
60. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben.
61. Erweisen sich die vorliegenden Ausgangsdaten als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter vor Versuchsbeginn oder vorzugsweise an einer nicht in die Versuchsgruppen einbezogenen Gruppe von Tieren in Betracht gezogen werden. Für weibliche Tiere müssen die Daten während der Laktation ermittelt werden.

PATHOLOGIE

Autopsie

62. Alle Versuchstiere sollten einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden. Sie umfasst eine sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Hirn-, Brust- und Bauchhöhle und ihres Inhalts. Dabei ist besonders auf die Organe des Fortpflanzungssystems zu achten. Die Anzahl der Implantationsstellen sollte vermerkt werden. Am Tag der Sektion ist ein Vaginalabstrich zu untersuchen, um das Stadium des Östruszyklus zu bestimmen und eine Korrelation zur histopathologischen Untersuchung der weiblichen Fortpflanzungsorgane zu ermöglichen.
63. Die Hoden und die Nebenhoden sowie die Prostata und die Samenbläschen zusammen mit den Koagulationsdrüsen aller adulten männlichen Tiere sollten ggf. von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Als Organgewichte können ferner die Gewichte des Muskelkomplex Levator ani/bulbospongiosus, der Cowperschen Drüsen und der Glans penis bei männlichen Tieren sowie der Ovarien (Nassgewicht) und des Uterus mit Zervix bei weiblichen Tieren gemessen werden; wenn diese Gewichte berücksichtigt werden sollen, sollten die Messungen möglichst umgehend nach der Sektion vorgenommen werden. Von allen adulten Tieren sollten die Ovarien, Hoden, Nebenhoden, akzessorischen Geschlechtsorgane und alle Organe aufbewahrt werden, die makroskopische Veränderungen aufweisen.
64. Von allen adulten männlichen und weiblichen Tieren sowie von einem männlichen und einem weiblichen Jungtier an Tag 13 je Wurf sollten die Schilddrüsen in dem am besten geeigneten Fixierungsmittel für die vorgesehene histopathologische Untersuchung aufbewahrt werden. Das Gewicht der Schilddrüse kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen. Die Blutproben müssen an einer benannten Stelle unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere entnommen und fachgerecht gelagert werden (Nummer 56).
65. Außerdem sollten bei mindestens fünf zufällig ausgewählten adulten männlichen und weiblichen Tieren je Gruppe (außer bei moribunden Tieren und/oder bei vor Ende der Untersuchung human getöteten Tieren) Leber, Nieren, Nebennieren, Thymus, Milz, Hirn und Herz von anhaftendem Gewebe befreit und möglichst umgehend nach der Sektion gewogen werden, bevor das Material eintrocknet. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Hirn (typische Regionen einschließlich Cerebrum, Cerebellum und Pons), Rückenmark, Auge, Magen, Dünn- und Dickdarm (mit Peyer'schen-Platten), Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Thymus, Trachea und Lungen (konserviert durch Inflation mit Fixierungsmittel und Immersion), Gonaden (Hoden und Ovarien), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen), Vagina, Harnblase, Lymphknoten (je nach Erfahrung des Labors sollte neben dem proximalsten drainierenden Lymphknoten ein weiterer Lymphknoten entnommen werden (16)), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis) vorzugsweise in der Nähe des Muskels, Skelettmuskel und Knochen mit Knochenmark (Schnitt oder wahlweise ein frisch fixiertes Knochenmarkaspirat). Es wird empfohlen, die

Hoden durch Immersion in Bouin'scher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung zu fixieren (16) (17) (18). Eine Fixation in Formalin ist für diese Gewebe nicht zu empfehlen. Um ein rasches Eindringen des Fixierungsmittels zu ermöglichen, kann die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften des Prüfstoffs als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

66. Die folgenden Gewebe können wichtige Hinweise auf endokrine Wirkungen geben: Gonaden (Ovarien und Hoden), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus mit Zervix, Nebenhoden, Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen, Prostata dorsolateral und ventral), Vagina, Hypophyse, männliche Brustdrüse und Nebennieren. Veränderungen der männlichen Brustdrüsen sind nicht ausreichend dokumentiert, bei diesem Parameter können aber sehr empfindliche Reaktionen auf Stoffe mit östrogenen Wirkung vorkommen. Die Beobachtung von nicht unter Nummer 65 genannten Organen/Geweben ist fakultativ.
67. Tote Jungtiere und Jungtiere, die an Tag 13 nach der Geburt oder kurz danach getötet wurden, sollten zumindest äußerlich sorgfältig auf auffallende Anomalien untersucht werden. Besondere Beachtung erfordern die externen Genitalien, die auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen sind.

Histopathologie

68. Die konservierten Organe und Gewebe der ausgewählten Tiere der Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe (unter besonderer Berücksichtigung der Spermatogenese in den männlichen Keimdrüsen und der Histopathologie der interstitiellen testikulären Zellstruktur) sollten einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen werden. Die Schilddrüsen von Jungtieren und von den übrigen adulten Tieren können erforderlichenfalls untersucht werden. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere anderer Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden. Der Leitfaden zur Histopathologie (10) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.
69. Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen. Um die Ermittlung der Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkungen (NOAEL) zu erleichtern, sollten Zielorgane in anderen Dosisgruppen untersucht werden, insbesondere in Gruppen, für die niedrige NOAEL-Werte angegeben wurden.
70. Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

71. Es sollten Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Außerdem sollten sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen weiblichen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben. Anlage 3 enthält ein tabellarisches Berichtsformat, das sich als sehr hilfreich für die Evaluierung der reproduktions- bzw. entwicklungstoxischen Wirkungen erwiesen hat.
72. Wenn möglich, sollten die numerischen Ergebnisse mittels einer geeigneten und allgemein anerkannten statistischen Methode ausgewertet werden. Durch Vergleiche der Wirkungen in einem Dosisbereich sollte die Anwendung multipler t-Tests vermieden werden. Die statistischen Methoden sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden. Statistische Analysen des AGD und der Brustwarzenretention sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. Gegebenenfalls sind die jeweiligen Würfe als Analyseeinheit anzunehmen. Statistische Analysen des Körpergewichts der Jungtiere sollten auf den Daten einzelner Jungtiere unter Berücksichtigung der Wurfgröße beruhen. Wegen des begrenzten Umfangs der Studie sind statistische Analysen in Form von „Signifikanzprüfungen“ für viele Endpunkte, insbesondere für reproduktionsbezogene Endpunkte, nur von begrenzter Bedeutung. Einige der am weitesten verbreiteten Methoden, besonders parametrische Untersuchungen anhand von Maßen der zentralen Tendenz, sind nicht geeignet. Wenn statistische Analysen durchgeführt werden, sollte die gewählte Methode der Verteilung der zu untersuchenden Variable angemessen sein und vor Beginn der Studie festgelegt werden.

Auswertung der Ergebnisse

73. Die Befunde dieser Toxizitätsstudie sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen sowie auf Nekropsie- und Mikroskopiebefunde zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Dosierung der Prüfchemikalie und vorhandenen Anomalien sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich makroskopischer Läsionen, identifizierter Zielorgane, Unfruchtbarkeit, klinischer Anomalien, beeinträchtigter Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaiger sonstiger toxischer Auswirkungen.
74. Wegen der kurzen Dauer der Behandlung der männlichen Tiere sollte bei der Bewertung der reproduktionstoxischen Wirkungen bei männlichen Tieren die Histopathologie der Hoden und der Nebenhoden zusammen mit den Fertilitätsdaten berücksichtigt werden. Die Einbeziehung verfügbarer historischer Kontrolldaten zur Reproduktions-/Entwicklungstoxizität (z. B. für Wurfgröße, AGD, Brustwarzenretention und Serumspiegel (T4)) kann bei der Auswertung der Studie ebenfalls hilfreich sein.
75. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

Prüfbericht

76. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

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

Einkomponentiger Stoff:

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

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- möglichst weitgehende Charakterisierung anhand der chemischen Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Vehikel (wenn verwendet):

- Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde.

Versuchstiere:

- Tierart/Stamm,
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn;

- Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

Prüfbedingungen:

- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitungsform des Prüfstoffs/des Futters, der erreichten Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfchemikalie;
- gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration des Prüfstoffs im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- genaue Beschreibung des Verfahrens für die Zufallsauswahl von Jungtieren zwecks Tötung (wenn Jungtiere getötet werden).

Ergebnisse

- Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts;
- gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und sonstige Anzeichen von Toxizität;
- Graviditätslänge;
- toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- Bewertung von sensorischer Aktivität, Greifkraft und motorischer Aktivität;
- hämatologische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;
- klinisch-biochemische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;
- Zahl adulter weiblicher Tiere mit normalem oder abnormalem Östruszyklus sowie Zyklusdauer;
- Anzahl der Lebendgeburten und der Postimplantationsverluste;
- Anzahl der Jungtiere mit sichtbaren erheblichen Anomalien, allgemeine Bewertung externer Genitalien, Anzahl der Kümmerlinge;
- Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;

- Anzahl der Implantate, Wurfgröße und Wurfgewichte zum Zeitpunkt der Aufzeichnung;
- Angaben zum Körpergewicht der Jungtiere;
- AGD aller Jungtiere (und Körpergewicht am Tag der AGD-Messung);
- Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren;
- Schilddrüsenhormonspiegel, Jungtiere an Tag 13 und adulte männliche Tiere (sowie Muttertiere und Jungtiere an Tag 4, wenn gemessen);
- Körpergewicht bei Tötung sowie Organgewichtsdaten für die Elterntiere;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- Absorptionsdaten, soweit vorhanden;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

Auswertung der Ergebnisse

77. Mit der Studie wird die Reproduktions-/Entwicklungstoxizität bei wiederholter Verabreichung bewertet. Insbesondere da der Schwerpunkt sowohl auf die allgemeine Toxizität als auch auf reproduktions-/entwicklungstoxische Endpunkte gelegt wird, ermöglichen die Prüfungsergebnisse eine Unterscheidung zwischen den Wirkungen auf die reproduktions-/entwicklungstoxische Wirkung, die ohne allgemeine Toxizität auftreten, und Veränderungen, die nur bei Dosen vorkommen, die auch bei Elterntieren toxisch wirken (Nummern 7-11). Die Untersuchung könnte Aufschluss über die Notwendigkeit der Durchführung weiterer Untersuchungen geben und zu Empfehlungen für die Gestaltung von Folgestudien führen. Als Hilfe bei der Auswertung der reproduktions- und entwicklungstoxischen Ergebnisse ist OECD Guidance Document Nr. 43 zu Rate zu ziehen (19). OECD Guidance Document Nr. 106 über die histologische Auswertung von Prüfungen zur Feststellung endokriner und reproduktionstoxischer Wirkungen bei Nagern (16) enthält Informationen zur Vorbereitung und Auswertung von (endokrinen) Organen und von Vaginalabstrichen, die für diese Prüfmethode hilfreich sein könnten.

LITERATUR

- (1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.-29. Oktober 1992. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (3) Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M., Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M. und Hayashi, Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol. Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y. und Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.

- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. und 11. März 1998. Auf Anfrage erhältlich bei der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (8) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M. und Cooper, R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), S. 84-97.
- (9) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston, C.R. und Short, R.V. (Hrsg.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No. 60).
- (11) Moser, V.C., McDaniel, K.M. und Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (12) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. und Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A. und MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (14) Gallavan, R.H. Jr., J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp und V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights“, *Reproductive Toxicology*, 13: S. 383-390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 106), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (17) Hess, R.A. und Moore, B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin, R.E. und Heindel, J.J. (Hrsg.). Academic Press: San Diego, CA, S. 52-85.
- (18) Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN (Siehe Auch (20) Oecd Gd 150)

Androgene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

Antiandrogene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antiöstrogene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. 17 β -Estradiol) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Antithyroide Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. T₃) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

Chemikalie Ein Stoff oder Gemisch.

Entwicklungstoxizität Das Auftreten einer reproduktionstoxischen Wirkung mit prä-, peri- und postnatalen, strukturellen oder funktionellen Störungen bei der Nachkommenschaft.

Dosis Die Menge der verabreichten Prüfchemikalie. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfchemikalie je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

Dosierung Ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

Offensichtliche Toxizität Ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfchemikalie. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

Fertilitätsstörungen Störungen der männlichen oder weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -fähigkeit.

Maternale Toxizität Schädliche Wirkungen auf trächtige weibliche Tiere, die entweder spezifisch (direkte Wirkungen) oder nicht spezifisch (indirekte Wirkungen) auftreten und mit dem Zustand der Gravidität in Zusammenhang stehen.

NOAEL Abkürzung für No Observed Adverse Effect Level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

Östrogene Wirkung Die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. 17 β -Estradiol).

Reproduktionstoxizität Schädliche Wirkungen auf die Nachkommenschaft und/oder Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Reproduktionsfunktionen oder -kapazität.

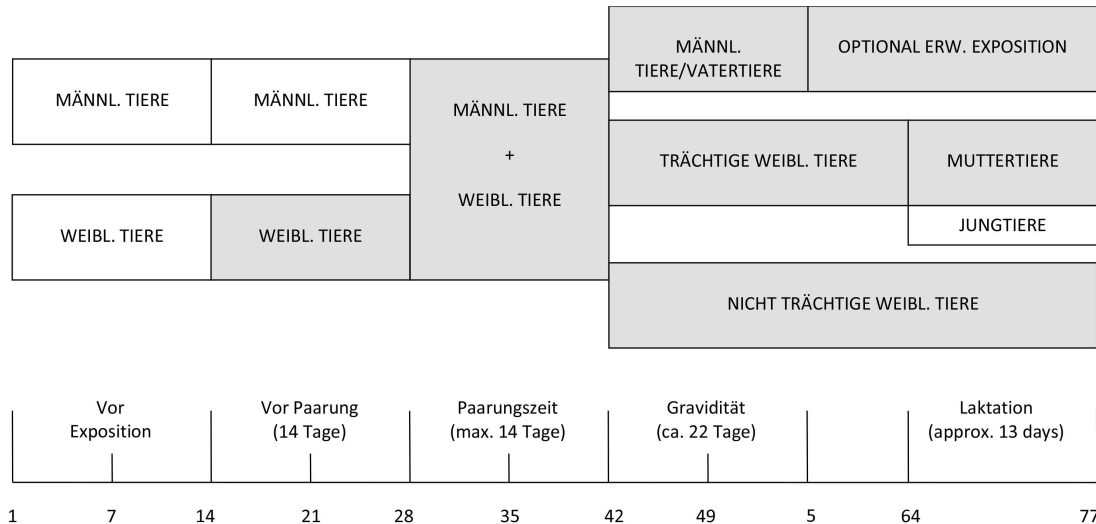
Prüfchemikalie Ein beliebiger Stoff oder ein beliebiges Gemisch, der/das nach dieser Methode geprüft wird.

Thyroide Wirkung Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. T₃) zu wirken.

Validierung Ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

Anlage 2

DIAGRAMM ZUM VERSUCHSPLAN MIT ANGABEN ZUR MAXIMALEN DAUER DER STUDIE AUSGEHEND VON DER VOLLSTÄNDIGEN 14-TÄGIGEN PAARUNGSZEIT



Beginn der Studie
Bewertung der Östruszyklen vor der Exposition; anschließend tägliche Vaginalabstriche ab Behandlungsbeginn bis zu Anzeichen für eine Besamung

Dosing

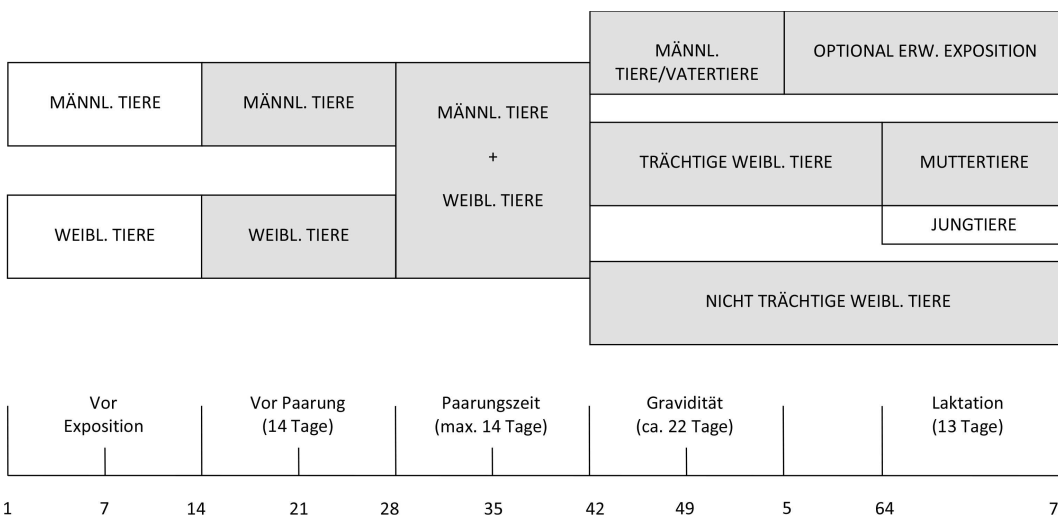
Nicht behandelt

Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchung bei männl. u. weibl. Tieren (fakultativ)

Sektion männl. Tiere/Vatertiere
Funktionelle Beobachtungen bei männl. Tieren (fakultativ)
Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchung bei männl. Tieren nach Tötung (nach mind. 4-wöchiger Behandlung)

Geburt (PND 0) bis PND 4; AGD bei allen Jungtieren (PND 0-PND 4; am selben Tag)
Tötung von 2 Jungtieren pro Wurf zur Messung von T4 (PND 4)

Tag 13 nach der Geburt
Sektion von weibl. Tieren und Jungtieren
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren
Sektion männl. Tiere/Vatertiere (fakultativ)



Beginn der Studie
Bewertung der Östruszyklen vor der Exposition; anschließend tägliche Vaginalabstriche ab Behandlungsbeginn bis zu Anzeichen für eine Besamung

Dosing

Nicht behandelt

Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchung bei männl. u. weibl. Tieren (fakultativ)

Sektion männl. Tiere/Vatertiere
Funktionelle Beobachtungen bei männl. Tieren (fakultativ)
Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchung bei männl. Tieren nach Tötung (nach mind. 4-wöchiger Behandlung)

Geburt (PND 0) bis PND 4; AGD bei allen Jungtieren (PND 0-PND 4; am selben Tag)
Tötung von 2 Jungtieren pro Wurf zur Messung von T4 (PND 4)

Tag 13 nach der Geburt
Sektion von weibl. Tieren und Jungtieren
Sektion männl. Tiere/Vatertiere (fakultativ)
Funktionelle Beobachtungen bei männl. (fakultativ) und weibl. Tieren
Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchung bei männl. u. weibl. Tieren (fakultativ)
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren

Anlage 3

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE REPRODUKTION/ENTWICKLUNG

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
	0 (Kontrolle)
Dosierung (Einheiten).					
Ausgangspaarungen (N)					
Östruszyklus (mindestens mittlere Dauer und Häufigkeit unregelmäßiger Zyklen)					
Weibliche Tiere mit Anzeichen für eine Besamung (N)					
Trächtige weibliche Tiere (N)					
Empfängnistage 1-5 (N)					
Empfängnistage 6- (N).. ⁽¹⁾ (1) (N)					
Gravidität ≤ 21 Tage (N)					
Gravidität = 22 Tage (N)					
Gravidität ≥ 23 Tage (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren (N)					
Muttertiere mit lebenden Jungtieren an Tag 4 pp (N)					
Implantate/Muttertier (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere bei Geburt (Mittelwert)					
Lebende Jungtiere/Muttertiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) bei Geburt (Mittelwert)					
Geschlechterverhältnis (m/w) an Tag 4 (Mittelwert)					
Wurfgewicht bei Geburt (Mittelwert)					
Wurfgewicht an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere bei Geburt (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere zum Zeitpunkt der AGD-Messung (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere)					
AGD der Jungtiere am selben Tag nach der Geburt, Geburt – Tag 4 (Mittelwert männliche Jungtiere, Mittelwert weibliche Jungtiere, PND vermerken)					

BEOBACHTUNGEN	WERTE				
Gewicht der Jungtiere an Tag 4 (Mittelwert)					
Gewicht der Jungtiere an Tag 13 (Mittelwert)					
Brustwarzenretention bei männlichen Jungtieren an Tag 13 (Mittelwert)					
JUNGTIERE MIT ANOMALIEN					
Muttertiere mit 0					
Muttertiere mit 1					
Muttertiere mit ≥ 2					
VERLUST AN NACHKOMMEN					
Pränatal (Implantationen abzüglich Lebendgeburten)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
Postnatal (Lebendgeburten abzüglich lebender Tiere an Tag 13 nach der Geburt)					
Weibliche Tiere mit 0					
Weibliche Tiere mit 1					
Weibliche Tiere mit 2					
Weibliche Tiere mit ≥ 3					
(1) letzter Tag der Paarungszeit					