

Auszug aus: Verordnung (EU) 2019/1390 der Kommission vom 31. Juli 2019 zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

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

=> zur aktuellen Fassung: [C.52 Medaka erweiterte 1-Generationen-Reproduktionstest \(MEOGRT\)²⁴](#)

Hinweis d. Red.: Text mit grauem Hintergrund ist gestrichen.

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 (EC_x), obwohl angemerkt werden sollte, dass EC_x-Ansätze sich selten für große Studien dieser Art eignen, bei denen die Steigerung der Prüfkonzentrationen zur Bestimmung der gewünschten EC_x 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 Prüfmethode eventuell eher (1). Der japanische Reiskarpfing 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 Reiskarpfing. 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 ≥ 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 ≥ 80 % (Durchschnitt) und ≥ 90 % (Durchschnitt) betragen (F1);
 - es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 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 Schlüpfinkubatoren 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 trägen 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 erneuert (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 Einrühren 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 Reiskarpfing *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 Reiskarpfing (siehe Abschnitt 1). Der Reiskarpfing 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 Salinenkrebse, *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 Reiskarpfing 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 Expositionsphase zweimal täglich mit Salinenkrebse 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 Kontrolle ohne Lösungsmittel 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 Expositionszeitraums 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 Expositionsphase sollte mit sexuell dimorphen, genetisch stimulierten adulten Fischen aus einem Laborbestand geschlechtsreifer Tiere, die bei 25 ± 2 °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 ± 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 Prüfungen auf akute Toxizität (Kapitel C.1 dieses Anhangs), kurzzeitiger Reproduktionstests für Fische (Kapitel C.48 dieses Anhangs) und anderer Prüfmethode, 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, polyzyklische 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 und 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 Abläichen tragen weibliche Reiskärpflinge 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 Inkubatorokammern 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 Behandlungspool 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 Fisches 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 Fisches 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.

Gewebeprobeentnahme und Vitellogenin-Messung

44. Die Leber wird seziiert und sollte bei ≤ -70 °C gelagert werden, bis die *vtg* mRNA (oder VTG) gemessen wird. Der Schwanz des Fisches, 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 Reiskarpfinge 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 Reiskarpfinge 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 Reiskarpfing mit einer Anzahl von mehr als 0 wird als Männchen definiert; ein Reiskarpfing 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 Fisches 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 Cochran-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 Fisches (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 Fisch (9 oder 10 wpf)	Überleben	F1
	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 Expositionsdauer 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			Subadultler Fisch		Adultler Fisch	
Endpunkte																			
Fruchtbarkeit	F ₀														F ₁				
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

- Der Versuchsplan hat 7 Replikatgruppen
 - 5 für Behandlungen mit Prüfchemikalien
 - 2 für Kontrollbehandlungen (4, wenn Lösungsmittel verwendet werden)
- Innerhalb des Gruppenplans
 - 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 subadultler Fische (Wochen 1 bis 9)

SSC: sekundäre Geschlechtsmerkmale;
Vtg: Vitellogenin

DATEN UND 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 Kontingenztafelverfahren 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.

Gepriüfte Fischart:

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

Prüfbedingungen:

- Fotoperiode(n);
- Testdesign (z. B. Kammerngröße, 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288–295.
- (11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78–86.

- (12) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro 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.
- (13) 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>.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (18) 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.
- (19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- (20) 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.
- (21) Kapitel C.15 dieses Anhangs, Fisch, Kurzfristige Toxizitätsprüfung an Embryonen und Jungfischen mit Dottersack.
- (22) Kapitel C.37 dieses Anhangs, 21-Tage Fisch-Screening-Assay: Ein Kurzzeittest zur Bestimmung der Östrogenen und Androgenaktivität und der Aromatasehemmung.
- (23) Kapitel C.41 dieses Anhangs, Fish Sexual Development Test (Test zur Geschlechtsentwicklung bei Fischen).
- (24) Kapitel C.48 dieses Anhangs, Kurzeit-Reproduktionstest an Fischen.
- (25) Kapitel C.47 dieses Anhangs, Toxizitätsprüfung an Fischen im frühen Entwicklungsstadium.

- (26) Kapitel C.49 dieses Anhangs, Prüfung auf akute Toxizität an Fischembryonen (FET).
- (27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L und Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (28) 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.
- (29) 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.
- (30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) 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 = Schlüpflinge/Anzahl an Embryos, die in einen Inkubator kommen

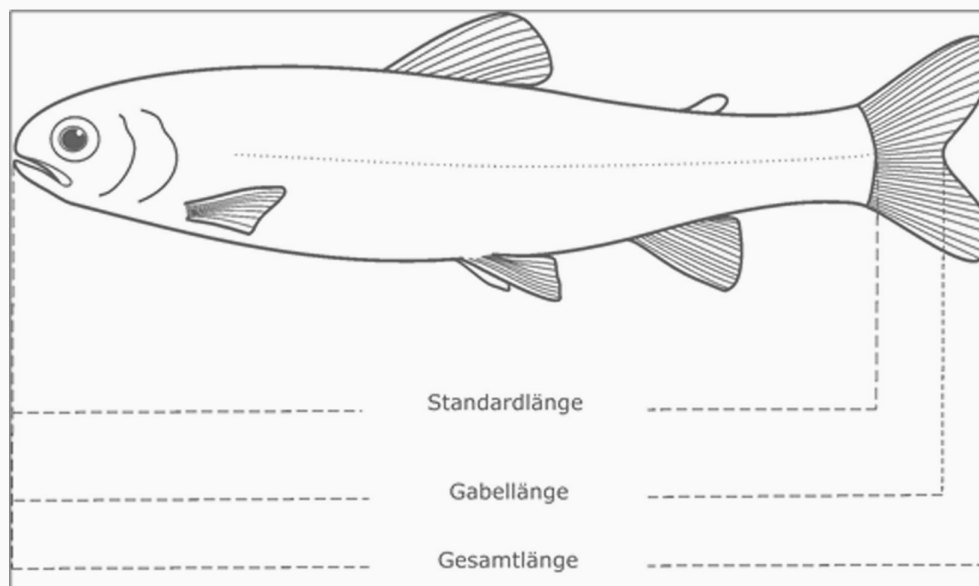
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

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 mit 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



EC_x: (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 Fisches 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	Höchstkonzentration
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 Reiskarpfing (<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).
5. Photoperiode	16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit
6. Besatz	F0: 2 adulte Fische/Replikate; F1: eingeleitet mit maximal 20 Eiern (Embryos)/Replikate, reduziert auf 12 Embryos/Replikate beim Schlüpfen, dann 2 adulte Fische (XX-XY-Brutpaar) bei 9–10 wpf für Fortpflanzungsphase
7. Minimales nutzbares Volumen der Prüfkammer	1,8 l (z. B., Größe der Prüfkammer: 18 x 9 x 15 cm)
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 Replikate	F0: 2 Fische (Paar aus Männchen und Weibchen); F1: maximal 20 Fische (Eier)/Replikate (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 Test	Mindestens 84 Fische in F0 und 504 in F1. (Wenn eine Lösungsmittelkontrolle verwendet wird, dann 108 Fische in F0 und 648 Fische in F1). Die gezählte Einheit ist der Embryo nach Eleuthero.
14. Fütterungsregime	Die Fische werden mit Salinenkrebse, <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 5).
15. Belüftung	Keine, außer der gelöste Sauerstoff nähert sich < 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts
16. Verdünnungswasser	Sauberes 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, vtg 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 niedrigen 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 1 000 oder 2 000 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 Reiskarpfinge 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 Eiern pro Paar pro Tag liegen und sogar bis zu 40 Eiern 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 lang 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

Zeit (nach dem Schlüpfen)	Salinenkrebs (mg Trockenmasse/Fisch/Tag)
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

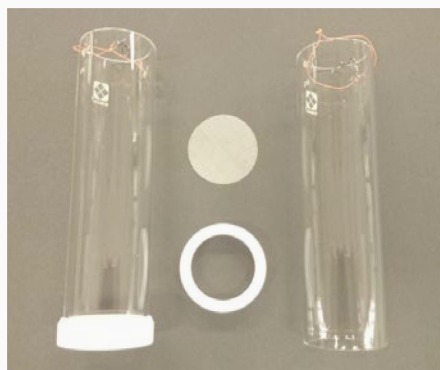
BEISPIELE EINER EIERINKUBATIONSKAMMER

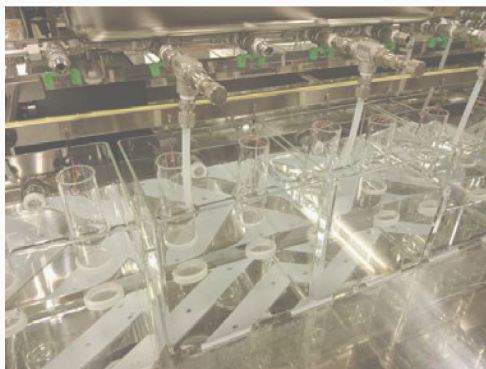
Beispiel A



Dieser Inkubator besteht aus einem Zentrifugenröhrchen aus durchtrenntem Glas, der über eine Edelhüllhülle verbunden ist und durch die obere Kappe der Zentrifugenschraube in seiner Position gehalten wird. Ein kleines Glas- oder Edelhüllröhrchen 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





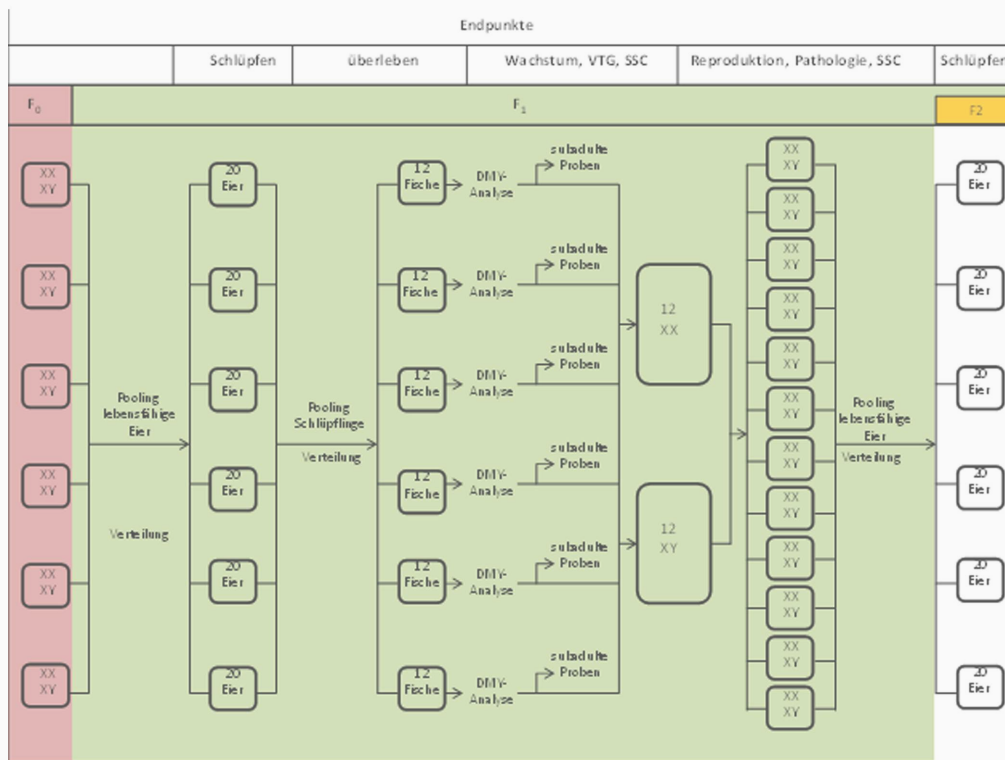
Der Inkubator besteht aus einem Glaszylinderkörper (5 cm Durchmesser und 10 cm Höhe) und Edelstahldrahtgeflecht (0,25 φ und 32 Maschenweite), das mithilfe eines PTFE-Rings an der Unterseite des Körpers befestigt ist. Die Inkubatoren für Eier von Reiskärpflingen werden von den Hebestangen in die Becken 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 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

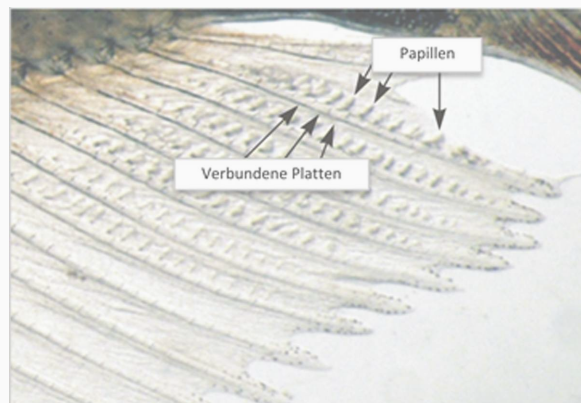
Wichtiges Material und Reagenzien

- 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 Gonadengewebe 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 2010).

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.

Prüfwoche 12 (F1)

An den Prüftagen 78–85 wird eine kleine Probe aus der Schwanzflosse jedes Fisches 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 Fisches 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 Endpunktdaten auf das genetische Geschlecht jedes einzelnen Fisches bezogen werden können.

Prüfwochen 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.

Prüfwochen 15–17 (F1)

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

Prüfwoche 18 (Wiederholung von Prüfwoche 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 angemessenere 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 Cochran-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 Trividi, 2013). Statistische Beratung wird empfohlen, wenn ein alternativer Ansatz verwendet wird.

Tägliche Eierzählung in einer einzelnen Generation

Das ANOVA-Modell ist gegeben durch $Y = \text{Zeit} \times \text{Zeit} + \text{Behandlung} + * \text{Behandlung} + \text{Zeit} \times \text{Behandlung} + * \text{Zeit} \times \text{Behandlung}$, 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 Niveauevergleiche 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 Vermehrungsraten-daten 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.

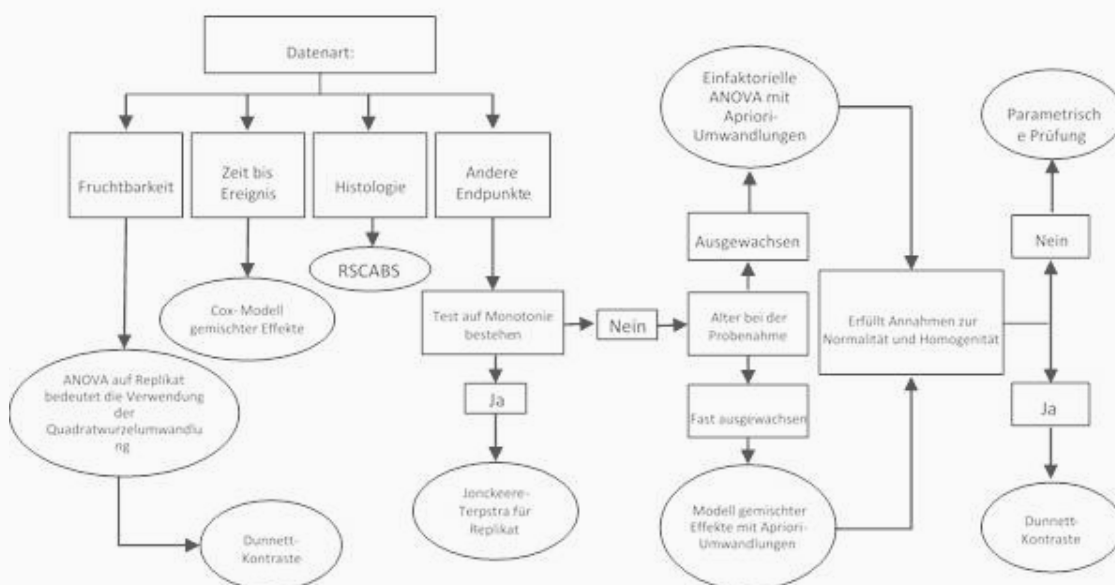
Für Gewicht und Länge werden keine Transformationen empfohlen, obwohl sie gelegentlich erforderlich sein könnten. Es wird jedoch eine log-Transformation für die Vitellogenin-Daten empfohlen; eine Quadratwurzeltransformation wird für die SSC-Daten empfohlen (Afterflosse und Papillen); eine Arkussinuswurzel-Transformation wird für die Daten zum proportionalen Schlüpfen, dem Prozentsatz an Überlebenden, dem Geschlechtsverhältnis und dem Prozentsatz an fruchtbaren Eiern empfohlen. Die Zeit bis zum Schlüpfen und die Zeit bis zum ersten Abblähen sollten als Zeit-bis-Ereignisdaten behandelt werden, wobei individuelle Embryos, die nicht im definierten Zeitraum schlüpfen, oder Replikate, die niemals abblähen, als rechts-zensierte Daten behandelt werden. Die Zeit bis zum Schlüpfen sollte über den medianen Tag des Schlüpfens 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 unterscheiden. Ein ähnliches Verfahren wird für Daten empfohlen, die in der Form von Prozentsätzen vorliegen (Fertilität, Schlüpfen 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 unterscheiden.

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 Amphibienspezies, 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 reproduktionstoxischen 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 amphibische 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, 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. 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 \times % 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 Tierbesätze 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 Eizellenreife 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-Verbindungen (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 $21 \pm 1\text{ °C}$ liegen und das Inter-Replikat und die Inter-Behandlungsdifferenzen sollten $1,0\text{ °C}$ nicht überschreiten;
- der pH-Wert der Prüflösung sollte zwischen 6,5 und 8,5 gehalten werden und das Inter-Replikate 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 ± 1 °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 gewährleisten. 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 verwendet) 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 trägen 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 Einrühren 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 zweilösungsmittelfreies 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, 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 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. ≤ 20 µl/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.

Hälderung der adulten Tiere und Zucht

23. Die angemessene Hälderung 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 Laichreife 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 800–1 000 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). Die Injektionsvolumen sollten ungefähr 10 µl/g Körpergewicht betragen (~1 000 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, Prüfmethode C.38 (25) und dem Frog Embryo Teratogenesis Test – *Xenopus* (23) und/oder Fischtests wie Prüfmethode 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 Bereichsfindungsstudie 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 eintritt), 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 Expositionsdauer 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 Abläichen 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 muss 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 Salinenkrebse, *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 komplette 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 jedem Replikatbecken 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 (± 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 Prüfgefäßen 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	Zwischenprobe- nahme (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 (Aufreten 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 Abbläuen und während des metamorphen Höhepunkts am sensibelsten gegenüber nicht chemisch induzierten Mortalitätsereignissen zu sein. Eine solche Mortalität könnte aus den Kontrolldaten ersichtlich sein.
39. Zusätzlich dazu sind Beobachtungen anormalen Verhaltens, deutlich sichtbare Fehlbildungen (z. B. Skoliose) oder Läsionen zu vermerken. Beobachtungen von Skoliose sollten gezählt (Aufreten) 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.

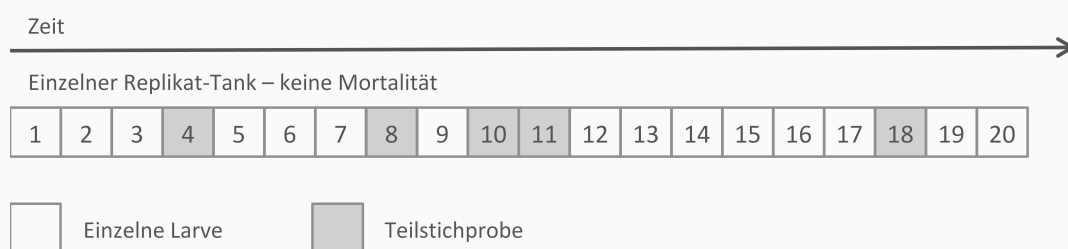
Larvale Teilstichprobenahme

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 Studientag, 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 Studientag, 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 Froshhaut 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.

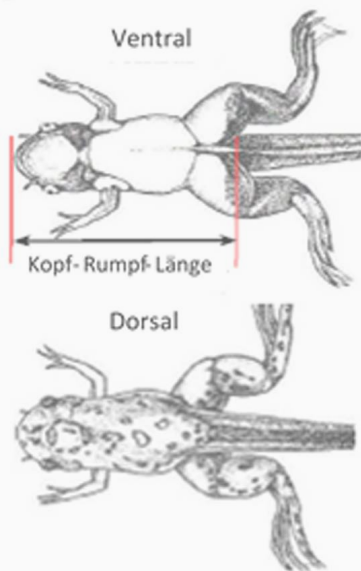
Gewebegewinnung und -fixierung

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).

a. Larvale Teilstichprobenahme (NF-Stadium 62)



b. Probenahme bei Jungtieren



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.

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 entwicklungs-technische 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 Expositionsdauer werden die verbleibenden Tiere (maximal 10 Frösche pro Replik) 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 Mikrozentrifugenröhrchen (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 Mikrozentrifugenröhrchen gelagert (Gewebeproben 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 seziiert 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 ungefähre 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 Geschlechtsmessungen können diese Beobachtungen verwendet werden, um die Phänotypischen/genotypischen Geschlechterverhältnisse zu berechnen.

DATEN UND 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 Histopathologiebewertungen.
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 ECx 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.

Gepüfte 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 $\alpha = 0,05$); EC_x 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: 1 565.
- (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: 2 469-2 474.
- (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, Tooi 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

EC_x: (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 Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) 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	Höchstkonzentration
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	<i>Xenopus laevis</i>
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/m ²) 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 Tiere 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: ≥ 40 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts oder ≥ 3,5 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 ± 1 °C und die Unterschiede zwischen den einzelnen Replikaten/Konzentrationen sollten < 1,0 °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 ≤ 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 ± 0,2 bzw. 11,5 ± 3 g erreichen, es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 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)
Tage 4–14 (in Wochen 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (ab Tag 8 bis 15) 1 ml (ab Tag 16)	0,5 ml (ab Tag 8 bis 15) 1 ml (ab Tag 16)
Woche 2	0,67 ml	2,4 ml		
Woche 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Woche 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Zeit (*) (Nach der Befruchtung)	Startfutter für Regenbogenforellen: Algae/Tetra-Fin [®] (oder ähnliches)		Salinenkrebse	
	Wochentag (drei Mal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)	Wochentag (zweimal pro Tag)	Wochenende (einmal pro Tag)
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 ExpressTM, 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 Salinenkrebse 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 Metamorphosedatum)	zerkleinerte Pellets (mg pro Fröschlein)	ganze Pellets (mg pro Fröschlein)
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 Metamorphosedatum 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. 69 506) 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 JumpStartTMTaq von Sigma erstelltes Probenprotokoll findet sich in **Tabelle 1**.

Tabelle 1

Probenprotokoll mithilfe von JumpStartTMTaq von Sigma

Master-Mix	1x (µl)	[Abschluss]
NFW (1)	11	—
10X Puffer	2,0	—
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,4	200 µM
Marker für Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker rev. Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrolle für Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrolle rev. Primer (8 µM)	0,8	0,3 µM

Master-Mix	1x (µl)	[Abschluss]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 Einheiten/µl
DNA-Vorlage	1,0	~200 pg/µl

(¹) nukleasefreies WasserHinweis: 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 µl
Vorlage	1,0 µl
Gesamt	<u>20,0 µl</u>

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 ge-	35 Zyklen
	hen.	
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
Na ₂ (EDTA)·2H ₂ O	3,72 g

Wasser zu 100 ml hinzufügen

1X TAE

H ₂ O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agarose

3 Teile NuSieve™ GTG™ 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 minimieren (¹).
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).

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.

(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).

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 Dickkopflritzen 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-Hybridisierungsöfen (oder schnell ausgleichender Luftinkubator) für Platten, Wasserbad für Röhren
- Sonstige gängige Laborausrüstungen, Chemikalien und Materialien.

Rezepte

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

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
Wasser	428 ml

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

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	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 Ziegen Serum (NGS)	3,75 ml
Waschpuffer	146,25 ml

Probennahme

Blut wird mit einem heparinisierten Mikrohämatokritröhrchen gesammelt und auf Eis gelegt. Nach einer 3-minütigen Zentrifugierung wird das Röhrchen ausgewertet, aufgebrochen und das Plasma in 0,6 ml-Mikrozentrifugenröhrchen 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 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 Ziegen Serums (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-Teströhrchen 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, 6 380, 3 190, 1 595, 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/B_0 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 hoch 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 B_0 -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-, B_0 - 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/B₀ berechnen

Den durchschnittlichen NSB-Wert von allen Messungen abziehen. Der B/B_0 wird für jede Probe und jeden Standard berechnet, indem der Absorptionswert (B) durch die durchschnittliche Absorption der B_0 -Probe geteilt wird.

Die Standardkurve ermitteln und unbekannte Mengen festlegen

Mithilfe einer Computergrafiksoftware (z. B. Slidewrite™ oder Sigma Plot®) eine Standardkurve erzeugen, die die Menge von B/B_0 der Probe auf der Grundlage des B/B_0 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_0), 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 Konfidenzintervalle 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 abstufende 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 abstufende 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

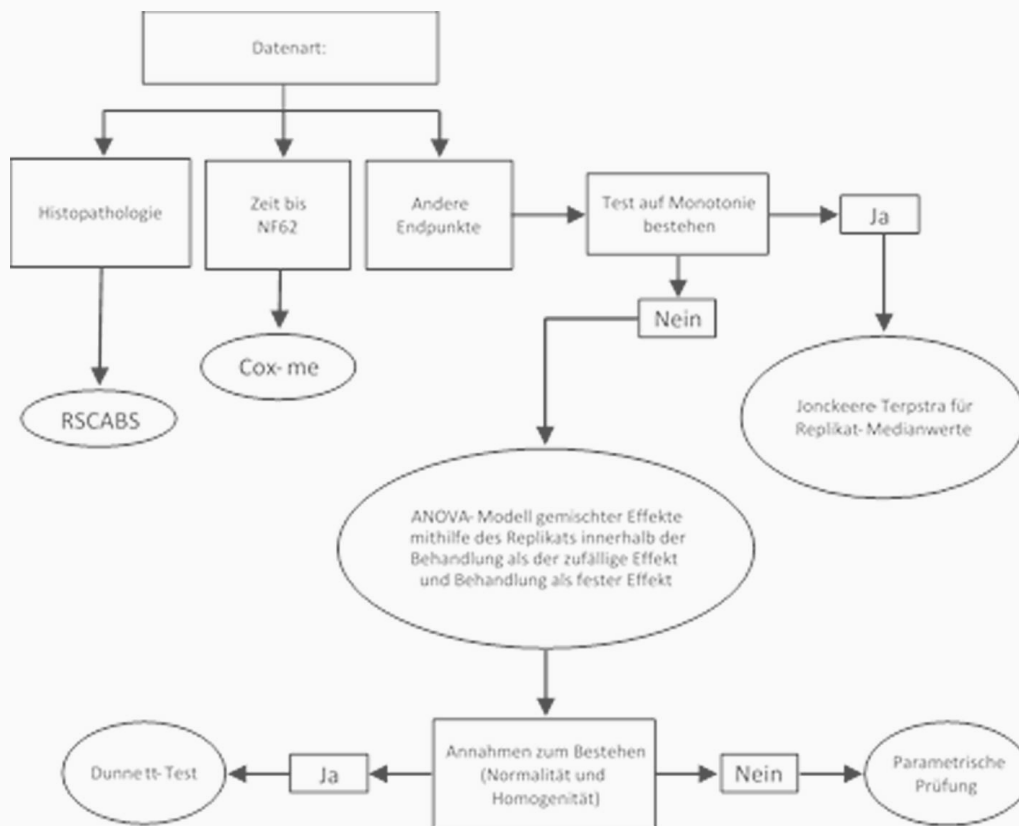
Zeit-zur-Metamorphose-Daten sollten wie Zeit-zum-Ereignis-Daten behandelt werden, wobei Mortalitäten oder Einzeltiere, die innerhalb von 70 Tagen nicht das NF-Stadium 62 erreichen, wie rechtszensierte Daten behandelt werden (d. h. der tatsächliche Wert ist größer als 70 Tage, aber die Studie endet, bevor 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 abstufige, 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, 1 108-1 116.

Anlage 8

ERWÄGUNGEN ZUR NACHVERFOLGUNG UND MINIMIERUNG DES AUFTRETENS 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 osteolathrogenic 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. Herraéz und P. Herraéz. 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.“
