

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 Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

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 Eizellenreifung fungieren. Eihüllen werden auf die Außenseite der Eizellen aufgetragen, während diese durch den Eileiter wandern, sich im Eibeutel sammeln und bereit für die Befruchtung sind. Die Eileiterentwicklung scheint durch Östrogene geregelt zu sein, während die Entwicklung mit dem Estradiolspiegel im Blut bei *X. laevis* (13) und *X. tropicalis* korreliert (12). Die Entwicklung von Eileitern bei Männchen nach der Exposition gegenüber polychlorierten Biphenyl-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 gewähren. Die Verfügbarkeit von Jod kann jedoch die Reaktionsfähigkeit des Schilddrüsensystems gegenüber den Schilddrüsenwirkstoffen beeinflussen, und es ist bekannt, dass Jod die Grundaktivität der Schilddrüse ändert, was bei der Auswertung der Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen der Schilddrüse zu beachten ist. Basierend auf der vorherigen Arbeit wurde die erfolgreiche Leistung des Tests aufgezeigt, wenn die Jodkonzentration des Verdünnungswassers (I^-) zwischen 0,5 und 10 $\mu\text{g/l}$ liegt. Idealerweise sollte die minimale Jodkonzentration im Verdünnungswasser während des Tests 0,5 $\mu\text{g/l}$ betragen (als Natrium- oder Kaliumsalz hinzugefügt). Wenn das Prüfwasser aus entionisiertem Wasser rekonstituiert wird, muss Jod in einer Konzentration von mindestens 0,5 $\mu\text{g/l}$ hinzugegeben werden. Die gemessenen Jodkonzentrationen aus dem Prüfwasser (d. h. Verdünnungswasser) und der Zusatz von Jod oder anderen Salzen (wenn 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 Laichreifung zu induzieren, wird drei bis fünf Paaren von adulten weiblichen und männlichen Tieren intraperitoneal humanes Choriongonadotropin (hCG) injiziert. Weibchen und Männchen werden beispielsweise mit ungefähr 800–1 000 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 Abbläuen 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 Salinenkrebsen, *Artemia* spp., 24 Stunden alte nauplii, gefüttert. Die larvale Fütterung, die in jedem Prüfgefäß konsistent sein sollte, sollte den Versuchstieren ein ordentliches Wachstum und eine gute Entwicklung ermöglichen, um die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Test-Ergebnisse zu gewährleisten: (1) die mediane Zeit bis zum NF-Stadium 62 bei den Kontrollen sollte ≤ 45 Tage betragen und (2) ein mittleres Gewicht innerhalb von $1,0 \pm 0,2$ g im NF-Stadium 62 bei den Kontrollen wird empfohlen.

Fütterung der Jungfische

34. Sobald die Metamorphose abgeschlossen wurde, besteht das Fütterungsregime aus sinkendem Premium-Froschfutter, z. B. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (Anlage 4). Für Fröschlein (frühe Jungfrösche) werden die Pellets kurz in einer Kaffeemühle, einem Mixer oder einem Mörser mit Stößel zerkleinert, um ihre Größe zu reduzieren. Sobald die Jungfrösche groß genug sind, um 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 Ablachen 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.

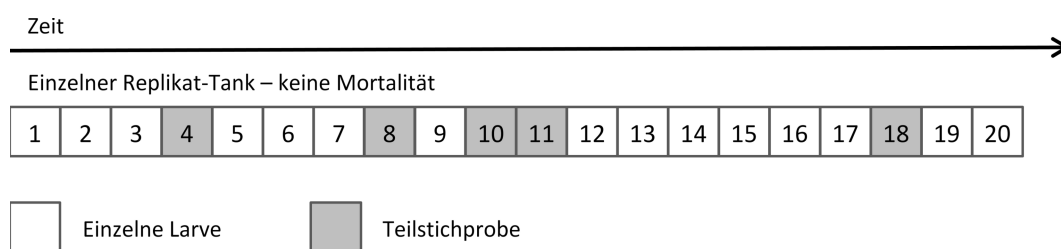
Larvale Teilstichprobenahme

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 ungedufferte 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 Zwickeln 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.

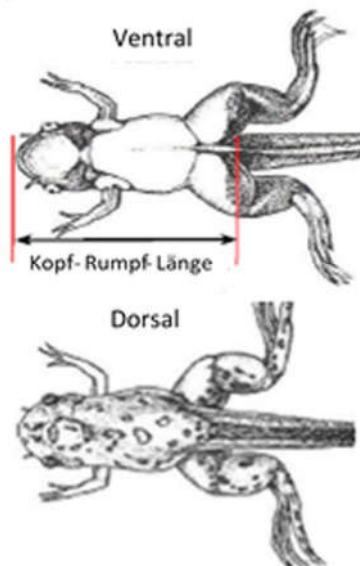
Gewebegewinnung und -fixierung

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

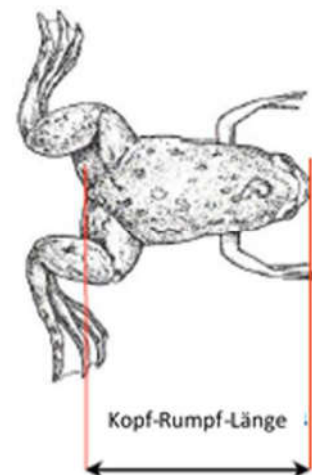


Abbildung 2: Orientierungspunkte für die Messung der Kopf-Rumpf-Länge für den LAGDA in NF-Stadium 62 (a) und bei Jungfröschen (b). Die definierenden Merkmale des NF-Stadiums 62 (a): der Kopf hat dieselbe Länge wie der Rumpf, die Länge des Riechnervs ist kürzer als der Durchmesser des Riechkolbens (dorsale 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 Replikat) getötet und die verschiedenen Endpunkte werden gemessen oder bewertet und aufgezeichnet: (1) Morphometrik (Gewicht und Länge), (2) phänotypische/genotypische Geschlechtsverhältnisse, (3) Lebergewicht (Leber-somatischer Index), (4) Histopathologie (Gonaden, Fortpflanzungsgänge, Leber und Niere) und optional (5) Plasma-VTG.

Schmerzfreies Töten von Fröschen

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

Morphometrik (Gewicht und Länge)

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

Plasma-VTG (Option)

54. VTG ist ein weit akzeptierter Biomarker, der aus der Exposition gegenüber östrogenen Chemikalien entsteht. Für den LAGDA kann Plasma-VTG optional innerhalb der Proben von Jungfröschen gemessen werden (dies kann besonders relevant sein, wenn von der Prüfchemikalie angenommen wird, dass sie ein Östrogen ist).
55. Die Hinterbeine des getöteten Jungfrosches werden aufgeschnitten und das Blut mit einer heparinisierten Kapillare gesammelt (obwohl sich alternative Methoden zum Sammeln von Blut, wie beispielsweise eine Herzpunktur, auch eignen können). Das Blut wird in ein 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.

Gepriüfte 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. Kammerngröße, 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 $\geq 3,5$ 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 $1,0 \pm 0,2$ bzw. $11,5 \pm 3$ 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 gehen.	35 Zyklen
Stufe 6.	72 °C	1 Min.
Stufe 7.	4 °C	halten

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

Agarosegel-Elektrophorese (3 %)(Probenprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Eisessig	5,71 ml
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.

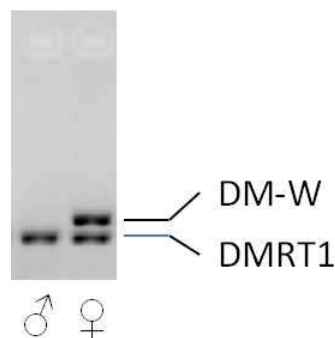


Abb. 1: Bild des Agarosegels, das das Bandmuster zeigt, das auf ein männliches (♂) Tier (einzelnes Band ~203 bp: DMRT1) und auf ein weibliches (♀) Tier hinweist (zwei Bänder bei ~259 bp: DM-W und 203 bp:DMRT1).

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 Ziegen Serum (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 Röhrchen

- 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/Bo 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. SlidewriteTM 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

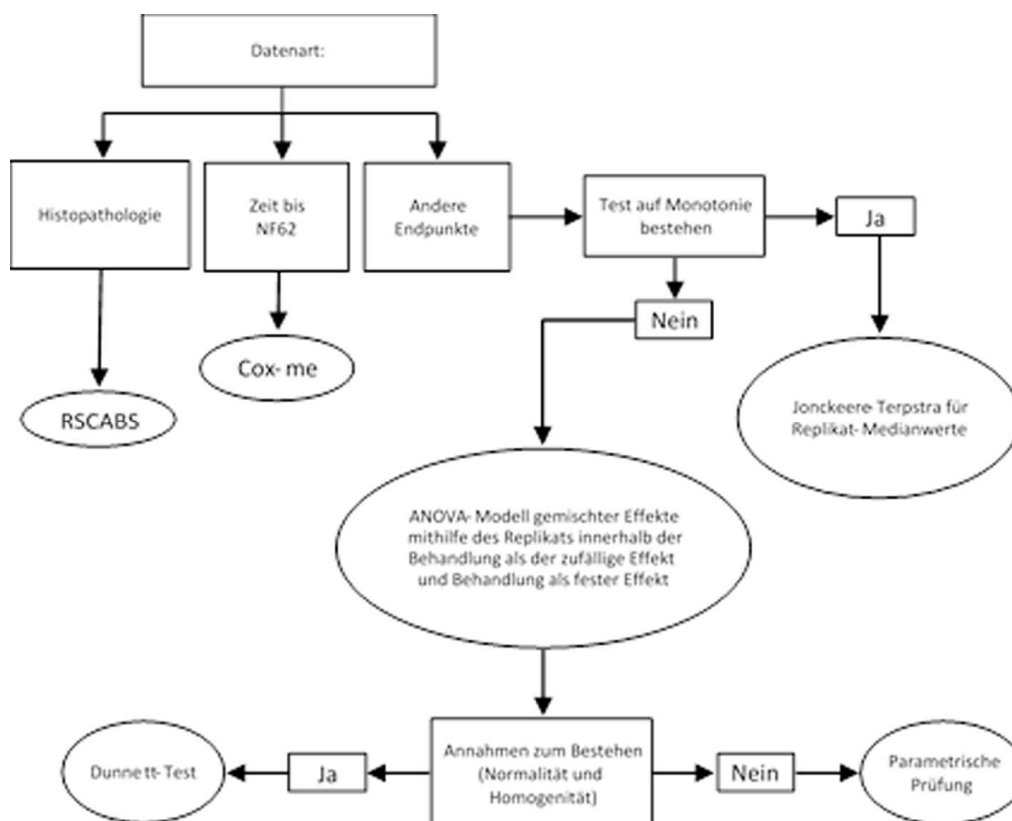
Zeit-zur-Metamorphose-Daten sollten wie Zeit-zum-Ereignis-Daten behandelt werden, wobei Mortalitäten oder Einzeltiere, die innerhalb von 70 Tagen nicht das NF-Stadium 62 erreichen, wie rechtszensierte Daten behandelt werden (d. h. der tatsächliche Wert ist größer als 70 Tage, aber die Studie endet, bevor 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-Produktgrenzschätzer bestimmt werden. Dieser Endpunkt sollte mithilfe eines proportionalen Gefahrenmodells nach Cox mit gemischten Effekten analysiert werden, das die Replikatstruktur der Studie berücksichtigt.

Histopathologiedaten (Schweregrade und Entwicklungsstadien)

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

Abb. 1:

Entscheidungsbaum der statistischen Analyse für LAGDA-Daten.



LITERATURHINWEISE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 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. Herraiez und P. Herraiez. 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.“
