

## II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

## KOMMISSION

## RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 18. November 1987

zur neunten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt

(87/302/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN  
GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen  
Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom  
27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwal-  
tungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kenn-  
zeichnung gefährlicher Stoffe <sup>(1)</sup>, zuletzt geändert durch die  
Richtlinie 79/831/EWG <sup>(2)</sup>, insbesondere durch Arti-  
kel 19,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Nach Artikel 3 Absatz 1 der Richtlinie 67/548/EWG erfolgt  
die Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften  
der Stoffe und Zubereitungen sowie ihrer Toxizität und  
Ökotoxizität nach den in Anhang V vorgesehenen Metho-  
den.

Nach Artikel 3 Absatz 2 der Richtlinie 67/548/EWG ist die  
tatsächliche oder potentielle Umweltgefahr eines Stoffes oder  
einer Zubereitung nach den Bestimmungen der Anhänge VII  
und VIII zu beurteilen.

Anhang V in der Fassung der Richtlinie 84/449/EWG <sup>(3)</sup>  
enthält zur Zeit nur Prüfmethode für die in Anhang VII  
angegebenen Eigenschaften; demzufolge müssen Methoden  
zur Messung der in Anhang VIII angegebenen Eigenschaften  
verfügbar gemacht werden.

Die Vorschriften dieser Richtlinie entsprechen der Stellung-  
nahme des Ausschusses zur Anpassung der Richtlinien zur

Beseitigung der technischen Handelshemmnisse bei gefähr-  
lichen Stoffen und Zubereitungen an den technischen Fort-  
schritt —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

*Artikel 1*

Anhang V zur Richtlinie 67/548/EWG wird durch den Text  
des Anhangs zu dieser Richtlinie ergänzt.

*Artikel 2*

Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen zum  
31. Dezember 1988 die erforderlichen Bestimmungen, um  
dieser Richtlinie nachzukommen, und setzen die Kom-  
mission hiervon unverzüglich in Kenntnis. Sie wenden diese  
Bestimmungen spätestens ab 30. Juni 1989 an.

*Artikel 3*

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 18. November 1987

*Für die Kommission*

Stanley CLINTON DAVIS

*Mitglied der Kommission*

<sup>(1)</sup> ABl. Nr. 196 vom 16. 8. 1967, S. 1.

<sup>(2)</sup> ABl. Nr. L 259 vom 15. 10. 1979, S. 10.

<sup>(3)</sup> ABl. Nr. L 251 vom 19. 9. 1984, S. 1.

*ANHANG*

Die nachstehend beschriebenen Methoden dienen dem Nachweis einiger toxischer und ökotoxischer Eigenschaften, die in Anhang VIII der Richtlinie 79/831/EWG des Rates angegeben sind. Für die Stufen 1 und 2 von Anhang VIII geeignete Prüfmethode sind nachstehend beschrieben, doch sind die Prüfungen nicht nach den einzelnen Stufen unterteilt.

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
TEIL B: Methoden zur Bestimmung der Toxizität .....	4
Allgemeine Einleitung: Teil B .....	4
Prüfung auf subchronische Toxizität nach oraler Applikation: 90-Tage-Test mit Nagern .....	8
Prüfung auf subchronische Toxizität nach oraler Applikation: 90-Tage-Test mit Nichtnagern .....	12
Prüfung auf subchronische Toxizität nach dermalen Applikation: 90-Tage-Test mit Nagern .....	16
Prüfung auf subchronische Toxizität nach Inhalation: 90-Tage-Test mit Nagern .....	20
Prüfung auf Teratogenität .....	24
Prüfung auf chronische Toxizität .....	27
Prüfung auf Kanzerogenität .....	32
Kombinierte Studie zur Prüfung auf Kanzerogenität und chronische Toxizität .....	37
Prüfung auf Reproduktionstoxizität während einer Generation .....	43
Prüfung auf Reproduktionstoxizität während zweier Generationen .....	47
Toxikokinetik .....	51
Mutagenität — (einschließlich prescreening betreffend krebserzeugende Eigenschaften) .....	55
— Genmutation — <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	55
— Mitotische Rekombination — <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58
— <i>In vitro</i> -Säugetierzellen — Gen-Mutationstest .....	61
— DNS-Schädigung und -Reparatur — Unplanmäßige DNS-Synthese (UDS) — Säugetierzellen — <i>in vitro</i> .....	64
— <i>In vitro</i> -Schwesterchromatidaustausch-Test .....	68
— Test zur Erfassung geschlechtsgebundener rezessiver — Letalmutationen an <i>Drosophila melanogaster</i> .....	71
— <i>In vitro</i> -Zelltransformationstest .....	73
— Säuger <i>in vivo</i> -Dominant-Letal-Test .....	76
— <i>In vivo</i> -Säuger-Keimzellzytogenetik .....	79
— <i>In vivo</i> -Säuger-Fellfleckenstest der Maus .....	82
— <i>In vivo</i> -Säuger-Translokationstest .....	85
TEIL C: Methoden zur Bestimmung der Ökotoxizität .....	88
Allgemeine Einleitung: Teil C .....	88
Algen: Prüfung der Wachstumshemmung .....	89
Toxizität für Regenwürmer: Prüfung in künstlichem Boden .....	95
Biologische Abbaubarkeit: Zahn-Wellens-Test .....	99
Biologische Abbaubarkeit: Simulationstest mit Belebtschlamm .....	106
Biologische Abbaubarkeit: Belebtschlamm: Prüfung der Atmungshemmung .....	118
Biologische Abbaubarkeit: Modifizierter S. C. A. S.-Test .....	123

## TEIL B: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT

### ALLGEMEINE EINLEITUNG: TEIL B

#### LANGZEITSTUDIEN

##### Subchronische, chronische Toxizität und Kanzerogenität

###### **Merkmale der Prüfsubstanz und des Behandlungsgemisches**

Die Zusammensetzung der Prüfsubstanz, einschließlich der Hauptverunreinigungen, ihre relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie die Stabilität der Substanz müssen vor Beginn einer Toxizitätsuntersuchung bekannt sein.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz sind mitentscheidend für die Auswahl des Verabreichungsweges, die Bewertung subchronischer, chronischer oder Kanzerogenitätsstudien sowie für die Handhabung und Lagerung der Prüfsubstanz.

Aus Informationen über die Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften lassen sich außerdem Rückschlüsse auf die Absorptionsmechanismen bei dem gewählten Verabreichungsweg sowie auf die Stoffwechselfvorgänge und die Gewebsverteilung ziehen. Aus vorangegangenen toxikologischen und toxikokinetischen Untersuchungen liegen gegebenenfalls zusätzliche Informationen über die toxikokinetischen Parameter vor.

Der eigentlichen Studie sollte daher die Entwicklung eines analytischen Verfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Prüfsubstanz (einschließlich Hauptverunreinigungen, sofern möglich) im Applikationsmedium und im biologischen Material vorausgehen.

###### **Versuchstiere: Auswahl der Arten und Stämme**

Da die Tiere für einen längeren Zeitraum ihres Lebens behandelt werden, besteht die Tendenz, die Untersuchungen auf leicht zu haltende und relativ kurzlebige Arten zu beschränken. Daher sollte die Inzidenz spontaner Erkrankungen und Tumorbildungen bei den eingesetzten Tierstämmen — sofern sie unter vergleichbaren Bedingungen gehalten werden — möglichst bekannt sein.

Die spezifischen Merkmale der verwendeten Stämme müssen bekannt und die Tiere frei von angeborenen Mißbildungen sein. Der Einsatz von Inzuchtstämmen oder F<sub>1</sub>-Hybriden bietet in dieser Hinsicht gewisse Vorteile; sofern jedoch genügend Hintergrunddaten über Auszuchtstämme zur Verfügung stehen, können auch Tiere aus definierten Tierbeständen verwendet werden.

###### **Tierhaltung, Versuchstierfutter und Trinkwasserversorgung**

Die Tierversuche sind in Übereinstimmung mit den einzelstaatlichen Bestimmungen durchzuführen und sollten humanen Kriterien und den neuesten internationalen Erkenntnissen im Bereich des Tierschutzes Rechnung tragen.

Eine strikte Überwachung der Umgebungsbedingungen und eine sorgfältige Tierhaltung bilden die Grundvoraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse. Faktoren wie Tierhaltung, interkurrente Erkrankungen, medikamentöse Behandlung, Verunreinigungen im Futter, der Frischluft, im Trinkwasser und Einstreu sowie die allgemeine Tierhaltung können das Resultat von Studien mit wiederholter Verabreichung von Prüfsubstanzen signifikant beeinflussen. Grundsätzlich sollte die Wirkungsweise chemischer Sterilisationsmittel auf Studien dieser Art bekannt sein.

Das Versuchstierfutter muß den Ernährungserfordernissen der eingesetzten Tierart entsprechen und frei von Verunreinigungen sein, die Einfluß auf das Prüfergebnis haben könnten. Den Nagern ist Futter und Wasser *ad libitum* bereitzustellen, wobei die Nahrung mindestens einmal wöchentlich erneuert werden muß. Derzeit finden drei verschiedene Futterarten Anwendung: die herkömmliche, die synthetische und verschiedene spezielle Futterformulierungen.

Bei jeder gewählten Futterform ist der Lieferant jedoch verpflichtet, den Nährwert und den Grad der Verunreinigung des Futters periodisch zu überwachen und die entsprechenden Informationen gleichzeitig mit jeder Futtercharge an das Laboratorium weiterzuleiten. Die Auswirkungen des gewählten Futters sowohl auf die Stoffwechselfvorgänge als auch auf die Entwicklung von Tumoren und die Lebensdauer der Tiere sollten daher bekannt sein.

Eine zusätzliche Prüfung des Futters sowohl auf Nahrungsmittelbestandteile als auch auf unbeabsichtigte Verunreinigungen, einschließlich Kanzerogene, kann gegebenenfalls vom Prüflabor durchgeführt werden. In diesem Fall sollten die Analysenergebnisse festgehalten und in den Schlußbericht zu jeder Prüfsubstanz aufgenommen werden.

Übliche Bestandteile des Futters, deren Einfluß auf die karzinogene Wirkung bekannt ist (z. B. Antioxidantien, ungesättigte Fettsäuren, Selen), dürfen nicht in beeinträchtigenden Konzentrationen in den Nahrungsmitteln enthalten sein. Angesichts des potentiellen Einflusses, den mehrere bekannte, in der Nahrung enthaltene Schadstoffe auf die Bewertung der Kanzerogenität haben, muß unbedingt auf Pestizidrückstände, Organochlorverbindungen und aromatische polyzyklische Kohlenwasserstoffe sowie Östrogene, Schwermetalle, Nitrosamine und Mykotoxine in der Nahrung geachtet werden.

Wird die Prüfsubstanz in Trinkwasser oder im Futter verabreicht, sind Stabilitätstests von wesentlicher Bedeutung. Anhand sorgfältig durchgeführter Stabilitäts- und Homogenitätstests, die vor dem eigentlichen Versuch mit wiederholter Dosierung durchgeführt werden, läßt sich die Häufigkeit der Futterzubereitung und der erforderlichen Überwachung ermitteln.

Wird das Futter sterilisiert, müssen die möglichen Auswirkungen dieser Behandlung auf die Prüfsubstanz und die Nahrungsbestandteile bekannt sein. Werden solche Einflüsse festgestellt, sind entsprechende Anpassungen vorzunehmen.

Während der Kanzerogenitätsstudien sollte auf potentielle Schadstoffe in dem verwendeten Wasser geachtet werden. Für den menschlichen Verbrauch bestimmtes Trinkwasser ist grundsätzlich geeignet; die jeweiligen Wasseranalysenwerte sollten vorliegen.

Die Konzentration der Prüfsubstanz im Futter muß gegebenenfalls an das Wachstum der Tiere angepaßt werden, um eine in Relation zum Körpergewicht konstante Aufnahme der Prüfsubstanz zu gewährleisten.

Der Nährwert des Futters für Versuchs- und Kontrolltiere sollte so ähnlich wie möglich sein. Aus diesem Grund muß der Nährwert der im Futter enthaltenen Prüfsubstanz berücksichtigt werden. Erfahrungsgemäß dürften bis zu 5 % einer nährwertfreien Prüfsubstanz keinen signifikanten Einfluß auf den Gesamtnährwert des Futters haben.

### 1. Inhalationsstudien

Es wurde kein Limit-Test festgelegt, da die Definition eines einheitlichen Expositionsgrenzwerts für die Inhalation nicht möglich war.

### 2. Teratogenitätsstudie

Diese Prüfmethode ist hauptsächlich auf die orale Verabreichung ausgelegt. Je nach den physikalischen Eigenschaften der Prüfsubstanz oder der wahrscheinlichsten Art der menschlichen Exposition können auch andere Verabreichungswege gewählt werden. In diesen Fällen ist das Prüfverfahren entsprechend anzupassen, wobei die jeweiligen Kriterien des 28-Tage-Tests zu berücksichtigen sind.

### 3. Toxikokinetik

Toxikokinetische Untersuchungen sind für die Interpretation und Bewertung von Toxizitätsdaten hilfreich. Mit diesen Untersuchungen sollen besondere Aspekte der Toxizität der zu prüfenden Chemikalie geklärt werden; die Ergebnisse können die Planung weiterer Toxizitätsuntersuchungen erleichtern. Es wird nicht davon ausgegangen, daß in jedem Fall sämtliche Parameter bestimmt werden müssen. Nur in seltenen Fällen ist die gesamte Folge der toxikokinetischen Untersuchungen (Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung) erforderlich. Bei bestimmten Verbindungen sind u. U. Änderungen dieser Reihenfolge ratsam; auch kann eine Prüfung mit nur einer Dosierung ausreichend sein.

#### Definitionen

- Toxikokinetik: umfaßt Untersuchungen zu Absorption, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung der Prüfsubstanzen.
- Absorption: ist der Vorgang, durch den die verabreichte Substanz in den Körper aufgenommen wird.
- Verteilung: ist der Vorgang, durch den die absorbierte Substanz und/oder ihre Stoffwechselprodukte im Körper verteilt werden.
- Stoffwechsel: ist der Vorgang, durch den die verabreichte Substanz im Körper durch enzymatische oder nichtenzymatische Reaktionen in ihrer Struktur umgewandelt wird.
- Ausscheidung: ist der Vorgang, durch den die verabreichte Substanz und/oder ihre Stoffwechselprodukte vom Körper ausgeschieden werden.

### 4. Untersuchung zur akuten und subakuten Wirkung an einer zweiten Tierart

Die Untersuchung an einer zweiten Tierart soll die aus der ersten Untersuchung gezogenen Schlußfolgerungen ergänzen.

Für eine solche Untersuchung kann die schon beschriebene Prüfmethode verwendet oder für eine kleinere Anzahl von Tieren angepaßt werden.

### 5. Fertilitätsuntersuchungen

Ist ein Drei-Generationen-Reproduktionstest erforderlich, kann das für den Zwei-Generationen-Reproduktionstest beschriebene Verfahren auf eine dritte Generation ausgedehnt werden.

### 6. Mutagenitätsuntersuchungen

Zusätzliche Mutagenitätsprüfungen einschließlich Screening-Untersuchungen auf Karzinogenität

In Anhang VIII der Richtlinie werden zusätzliche Untersuchungen aufgeführt, die zur Ermittlung der Mutagenität oder als Screening-Untersuchungen im Hinblick auf eine karzinogene Wirkung dienen. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen können im allgemeinen für beide Zwecke eingesetzt werden.

Die ersten Untersuchungen zur Mutagenität eines Stoffes umfassen Prüfverfahren auf Gen-(Punkt-)Mutationen in Bakterien sowie auf zytogenetische Schäden in Säugetierzellen (*in vitro* oder *in vivo*); geeignete Verfahren für diese Untersuchungen in der Grundstufe wurden weiter vorn beschrieben. Dieser Abschnitt befaßt sich mit ergänzenden Untersuchungen, die sich für die Verifizierung und/oder Vertiefung der mit den Prüfungen in der Grundstufe erzielten Ergebnissen eignen und die mehreren Zwecken dienen:

1. Bestätigung der Ergebnisse, die in Untersuchungen in der Grundstufe erzielt wurden;
2. Untersuchungen von Endpunkten, die in Untersuchungen der Grundstufe nicht erfaßt wurden;
3. Erstmalige oder vertiefende *in vivo*-Untersuchungen.

Für diese Zwecke umfassen die beschriebenen Prüfverfahren eukaryote *in vitro*- und *in vivo*-Systeme sowie eine größere Zahl biologischer Endpunkte. Die Prüfungen geben Aufschluß über Punktmutationen in Organismen, die komplexer sind als die in Untersuchungen der Grundstufe verwendeten Bakterien und liefern genauere Informationen über die Fähigkeit eines Stoffes, Chromosomenaberrationen zu induzieren.

Auch Prüfmethode auf Gentoxizität werden beschrieben, bei denen weder Punktmutationen noch Chromosomenaberrationen als solche nachweisbar sind. Sie liefern ergänzende Informationen und können je nach Bedarf in die Prüfprogramme eingefügt werden.

Als allgemeines Prinzip gilt: Ein Programm zur weiteren Untersuchung der Mutagenität ist so aufzubauen, daß die Prüfungen zusätzliche relevante Informationen über das mutagene und/oder karzinogene Potential des jeweiligen Stoffes erbringen.

Welche Untersuchungen jeweils in einem spezifischen Fall geeignet sind, hängt von zahlreichen Faktoren ab, z. B. den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Stoffes, den Ergebnissen der ersten bakteriellen und zytogenetischen Untersuchungen, dem Stoffwechselprofil des Stoffes, den Ergebnissen anderer Toxizitätsuntersuchungen und den bekannten Verwendungszwecken des Stoffes. Ein starres Schema für die Auswahl der Prüfungen ist daher angesichts der Vielzahl der unter Umständen zu berücksichtigenden Faktoren nicht angebracht. Einige allgemeine Grundsätze können jedoch als Richtschnur dienen. War eine der Untersuchungen der Grundstufe positiv, sollten die Zusatzuntersuchungen mindestens einen Test umfassen, mit dem sich der gleiche genetische Endpunkt ermitteln läßt. Waren beide Untersuchungen der Grundstufe negativ, sollte normalerweise im Rahmen der Zusatzuntersuchungen sowohl ein Test auf Genmutationen als auch ein Test auf Chromosomenaberrationen durchgeführt werden. Auch ist es unter Umständen angebracht, zusätzliche Daten mit Hilfe der Indikatortests (siehe unten) zu beschaffen. Im folgenden sind derartige Untersuchungsverfahren nach ihrem wichtigsten genetischen Endpunkt gruppiert.

#### Prüfungen zur Untersuchung von Gen-(Punkt-)Mutationen

Zur weiteren Untersuchung der Fähigkeit eines Stoffes, Gen-(Punkt-)Mutationen auszulösen, hat man die Wahl zwischen den folgenden Tests:

- a) Vorwärts- oder Rückmutationstests unter Verwendung eukaryoter Mikroorganismen (*Saccharomyces cerevisiae*)
- b) *in vitro*-Tests zur Untersuchung von Vorwärtsmutationen an Säugetierzellen,
- c) Test zur Erfassung geschlechtsgebundener rezessiver Letalmutationen an *Drosophila melanogaster*,
- d) *in vivo*-Test zur Untersuchung somatischer Zellmutation: Maus-Fellflecken-Test.

#### Prüfungen zur Untersuchung von Chromosomenaberrationen

Besteht die Notwendigkeit zur weiteren Untersuchung eines Stoffes im Hinblick auf die Fähigkeit, Chromosomenaberrationen zu induzieren, hat man die Wahl zwischen den folgenden Prüfverfahren:

- a) zytogenetische *in vivo*-Tests an Säugetieren;

Hier ist die Metaphasen-Analyse von Zellen aus dem Knochenmark *in vivo* exponierter Säugetiere angebracht, soweit sie nicht schon im Rahmen der ersten Prüfungen (Untersuchungen der Grundstufe) durchgeführt wurde. Außerdem können Keimzellen von Säugetieren zytogenetisch untersucht werden;

- b) zytogenetische Tests an Zellen des Säugers *in vitro*, sofern diese nicht im Rahmen der ersten Untersuchungen durchgeführt wurden;
- c) Dominant-Letal-Test bei Nagetieren;
- d) Test zur Untersuchung vererbbarer Translokationen bei der Maus.

#### *Indikatortests zur Ermittlung der Auswirkungen auf die DNS*

Es stehen Verfahren zur Verfügung, die Hinweise auf DNS-Schädigung liefern, ohne daß Punkt- oder Chromosomenmutationen als genetische Endpunkte erfaßt werden. Diese Tests können ergänzende Informationen zu den Ergebnissen der Mutagenitätsuntersuchungen liefern, die bei der Interpretation der Ergebnisse solcher Untersuchungen nützlich sein können. Sind solche Tests erforderlich, hat man die Wahl zwischen folgenden Verfahren unter Untersuchung eukaryoter Mikroorganismen oder Säugetierzellen:

- a) Mitotische Rekombination an *Saccharomyces cerevisiae*,
- b) DNS-Schädigung und -Reparatur — außerplanmäßige DNS-Synthese an Zellen des Säugers *in vitro*,
- c) Analyse von Schwester-Chromatid-Austauschen an Zellen des Säugers *in vitro*.

#### *Sonstige Indikatortests im Hinblick auf ein karzinogenes Potential*

Es stehen Zelltransmutations-Tests zur Verfügung, die die Fähigkeit eines Stoffes messen, morphologische und Wachstums-Veränderungen in Säugetierkulturen auszulösen, die man mit malignen Transformationen *in vivo* in Zusammenhang bringt. Dazu lassen sich eine Reihe verschiedener Zelltypen und Transformationskriterien verwenden.

#### *Bewertung des Risikos erblicher Auswirkungen an Säugetieren*

Es stehen Verfahren zur Verfügung, um beim Säuger *in vivo* vererbare Schäden zu untersuchen, die durch Gen-(Punkt-)Mutationen (Spezifische Genlocusmethode <sup>(1)</sup>) oder durch Chromosomenaberrationen (Test zur Untersuchung vererbbarer Translokationen bei der Maus) ausgelöst wurden.

Solche Verfahren können zur Abschätzung des gegebenen potentiellen genetischen Risikos eines Stoffes für den Menschen dienen. Jedoch müssen angesichts der Komplexität dieser Prüfverfahren und der dazu benötigten sehr großen Anzahl von Versuchstieren — was vor allem für die spezifische Genlocusmethode bei der Maus gilt — besondere Gründe für eine Durchführung dieser Prüfungen vorliegen.

---

<sup>(1)</sup> Die spezifische Genlocusmethode (mouse specific locus test), die in diesem Dokument nicht beschrieben wird, kann dazu dienen, Keimzellmutationen in der ersten Generation nach Exposition gegenüber einem mutagenen Stoff zu erfassen. Mit dem Test lassen sich genetische Veränderungen ermitteln und quantifizieren, die zu Veränderungen der Genprodukte führen, welche ihrerseits sichtbare Phänotypen erzeugen.

## PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH ORALER APPLIKATION

## 90-TAGE-TEST MIT NAGERN

**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird mehreren Versuchstiergruppen täglich in abgestuften Dosierungen oral verabreicht, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 90 Tagen. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezziert.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode***Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

Die Prüfsubstanz kann im Futter, mit der Magensonde, in Kapseln oder im Trinkwasser verabreicht werden. Sie sollte allen Tieren während des gesamten Versuchszeitraums nach der gleichen Methode verabreicht werden. Wird zur Vereinfachung der Verabreichung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz beigegeben, muß dessen nichttoxische Wirkung gesichert sein. Dazu können ggf. Daten aus vorangegangenen Versuchen herangezogen werden.

*Versuchsbedingungen***Versuchstiere**

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, ist die Ratte zu bevorzugen. Es sind junge gesunde Tiere bekannter Versuchstierstämme zu verwenden. Bei Versuchsbeginn sollten die Ratten vorzugsweise jünger als 6 Wochen, in keinem Fall jedoch über 8 Wochen alt sein und die Schwankungen im Körpergewicht zu Beginn des Versuchs nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

**Anzahl und Geschlecht**

Mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) sind für jede Dosierung zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 20 Tieren (10 Tiere pro Geschlecht) über 90 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden, um während eines Zeitraums von 28 Tagen nach der Behandlung auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen achten zu können.

### Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe zu wählen. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Wird zur Erleichterung der Verabreichung ein Vehikel benutzt, so ist dieses der Kontrollgruppe in gleicher Weise zu verabreichen wie den behandelten Tieren und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Wirkungen auftreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so muß die niedrigste Dosierung diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt.

In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Wird die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, so ist entweder eine konstante Konzentration (ppm oder mg/kg im Futter) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht der Tiere zu wählen; jede Abweichung von diesem Schema ist zu begründen. Wird die Substanz mit der Magensonde verabreicht, sollte dies täglich etwa zur gleichen Zeit erfolgen. Die Dosierungen sollten in regelmäßigen Zeitabständen (wöchentlich oder vierzehntägig) angepaßt werden, um ein in Relation zum Körpergewicht des Tieres konstantes Dosierungsniveau zu gewährleisten.

### Limit-Test

Wird ein 90-Tage-Test entsprechend dem nachstehend beschriebenen Verfahren durchgeführt und verursacht die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bzw. einer höheren Dosis, die einer bekannten Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Effekte, so kann auf eine weitere Prüfung verzichtet werden. Wird eine Prüfsubstanz mit geringer Toxizität mit dem Futter verabreicht, so muß sichergestellt sein, daß weder die zugeführte Menge noch sonstige Eigenschaften der Prüfsubstanz die normalen Ernährungsbedingungen beeinträchtigen.

### Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten und deren Auftreten, Grad und Dauer aufzuzeichnen. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

### Versuchsdurchführung

Den Tieren wird die Prüfsubstanz vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche während eines Zeitraums von 90 Tagen verabreicht. Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 28 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen.

Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futteraufnahme (und die Wasseraufnahme bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Trinkwasser) und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während des Versuches nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Nach Abschluß des Versuches werden alle überlebenden Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Satellitengruppe, seziert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

- a) eine ophthalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophthalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Geräts sollte vor der Verabreichung der Prüfsubstanz und zum Abschluß der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen an den Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen;
- b) am Ende des Versuches sind hämatologische Untersuchungen einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differentialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, — z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl — durchzuführen;
- c) am Ende des Versuches sind ebenfalls klinisch-chemische Untersuchungen des Blutes durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen: Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise

der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose (mit auf die Tierart abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup>, Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>, Ornithin-Decarboxylase, Gamma-Glutamyl-transpeptidase, Harnstickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamtbilirubin- und -Serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren/Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen;

- d) in der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

Erweisen sich Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter vor Versuchsbeginn in Betracht gezogen werden.

#### Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen, einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen, sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren; alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von Trachea und Lungen, Herz, Aorta, (Speicheldrüse), Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, (akzessorische Geschlechtsorgane), (Haut), Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weibliche Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark, (Augen), (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränendrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

#### Histopathologische Untersuchung

- a) Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung der Organe und Gewebe durchzuführen.
- b) Alle Organe mit makroskopischen Veränderungen sind zu untersuchen.
- c) Die Zielorgane der Tiere der anderen Dosisgruppen sind zu untersuchen.
- d) Die Lungen der Tiere in der Gruppe mit niedrigster und mittlerer Dosierung sind zur Feststellung einer möglichen Infektion histopathologisch so zu untersuchen, daß eine geeignete Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere möglich ist. Eine histopathologische Untersuchung der Leber und der Nieren dieser Versuchstiere ist ebenfalls in Betracht zu ziehen. Weitere histopathologische Untersuchungen der Tiere dieser Gruppen sind routinemäßig nicht erforderlich, müssen jedoch bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung stets für alle geschädigten Organe durchgeführt werden.
- e) Wird eine Satellitengruppe verwendet, so sind jene Organe und Gewebe histopathologisch zu untersuchen, die in den behandelten Gruppen auf die Prüfsubstanz reagierten.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderung sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art von Veränderungen, hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

- nichttoxische Dosis, sofern möglich;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnisse einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH ORALER APPLIKATION  
90-TAGE-TEST MIT NICHTNAGERN

1. **METHODE**

1.1. **Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.2. **Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.3. **Bezugssubstanzen**

Keine.

1.4. **Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird mehrere Versuchstiergruppen (Nichtnager) täglich in abgestuften Dosierungen oral verabreicht, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 90 Tagen. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezirt.

1.5. **Qualitätskriterien**

Keine.

1.6. **Beschreibung der Methode**

*Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

Die Prüfsubstanz kann im Futter oder in Kapseln verabreicht werden. Andere Verabreichungswege sind ebenfalls zulässig. Die Verabreichung sollte während des gesamten Versuchszeitraums bei allen Tieren nach der gleichen Methode erfolgen. Wird zur Vereinfachung der Verabreichung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz beigegeben, muß dessen nichttoxische Wirkung gesichert sein. Dazu können ggf. Daten aus vorangegangenen Versuchen herangezogen werden.

*Versuchsbedingungen*

**Versuchstiere**

Der am häufigsten verwendete Nichtnager ist der Hund, vorzugsweise aus einer bestimmten Zucht. Andere Nichtnager können ebenfalls eingesetzt werden. Es sind junge gesunde Tiere auszuwählen; das günstigste Alter für den Beginn der Behandlung liegt beim Hund zwischen 4 und 6 Monaten, spätestens bei 9 Monaten. Wird eine subchronische orale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollte in beiden Untersuchungen die gleiche Tierart/Rasse eingesetzt werden.

**Anzahl und Geschlecht**

Mindestens 8 Tiere (4 weibliche und 4 männliche) sind für jede Dosierung zu verwenden. Die Zahl der Tiere bei Abschluß der Untersuchung muß entsprechend groß sein, um eine aussagefähige Bewertung der toxischen Wirkung vornehmen zu können.

**Dosierungen**

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe zu wählen. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genau so zu behandeln wie die Versuchstiere. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Wirkungen auftreten, die Tiere jedoch nicht sterben. Die

niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so muß die geringste Dosierung diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt.

In den Gruppen mit niedrigster und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollten ebenfalls keine Todesfälle auftreten.

Wird eine Prüfsubstanz mit geringer Toxizität mit dem Futter verabreicht, so muß sicher gestellt sein, daß die zugefügte Menge die normalen Ernährungsbedingungen nicht beeinträchtigt.

Wird die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, so ist entweder eine konstante Konzentration (ppm oder mg/kg im Futter) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht des Tieres zu wählen; jede Abweichung von diesem Schema ist zu begründen. Wird die Substanz direkt, z. B. in einer Kapsel verabreicht, sollte dies täglich etwa zur gleichen Zeit erfolgen. Die Dosierungen sollten gegebenenfalls wöchentlich angepaßt werden, um ein in Relation zum Körpergewicht des Tieres konstantes Dosierungsniveau zu gewährleisten. Wird eine subchronische Studie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollte in beiden Fällen ein ähnliches Futter gewählt werden.

#### Limit-Test

Wird ein 90-Tage-Test entsprechend dem nachstehend beschriebenen Verfahren durchgeführt und verursacht die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bzw. einer höheren Dosis, die einer bekannten Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Effekte, so kann auf eine weitere Prüfung verzichtet werden.

#### Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten und deren Auftreten, Grad und Dauer aufzuzeichnen. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

#### Versuchsdurchführung

Den Tieren wird die Prüfsubstanz vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche während eines Zeitraums von 90 Tagen verabreicht. Wird die Prüfsubstanz nicht mit der Nahrung verabreicht, ist aus praktischen Gründen auch eine Stägige Behandlung zulässig.

Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futtermittelaufnahme (und die Wasseraufnahme bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Trinkwasser) und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt.

Die Tiere müssen täglich sorgfältig klinisch untersucht werden, um sicherzustellen, daß der Tierverlust während des Versuches so gering wie möglich bleibt. Nach Abschluß des Versuchs werden alle überlebenden Tiere seziiert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziiert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

- a) eine ophthalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophthalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Geräts sollte vor der Verabreichung der Prüfsubstanz und zum Abschluß der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen an den Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen;
- b) zu Beginn des Versuchs, danach entweder in monatlichen Abständen oder nach der Hälfte der Prüfperiode und zum Abschluß des Versuchs sind hämatologische Untersuchungen, einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differentialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl;
- c) klinisch-chemische Untersuchungen des Blutes sind zu Beginn des Versuchs, danach entweder in monatlichen Abständen oder nach der Hälfte der Prüfperiode und zum Abschluß des Versuchs durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen:

Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchternblutglukose (mit auf die Tierart/Rasse abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup>, Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>, Ornithin-Decarboxylase, Gamma-Glutamyl-transpeptidase, Harnstickstoff, Albumin,

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

Kreatinin, Gesamtbilirubin- und -Serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren/Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen. Bei Nichtnagern sollte der Blutentnahme eine Fastenperiode (von nicht mehr als 24 Stunden) vorgeschaltet werden;

- d) in der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

#### Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren, Schilddrüse (einschließlich Nebenschilddrüse) und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren: alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von (Trachea) und Lungen, Herz, Aorta, Speicheldrüse, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, (akzessorische Geschlechtsorgane), (Haut), Gallenblase, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weibliche Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark, (Augen), (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränendrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

#### Histopathologische Untersuchung

Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung der Organe und Gewebe durchzuführen. In den anderen Dosisgruppen sollte eine derartige Untersuchung an jenen Organen durchgeführt werden, die in der Gruppe mit der höchsten Dosierung Veränderungen aufweisen oder wenn es die klinische Beobachtung als notwendig erscheinen läßt.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderungen sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art von Veränderungen hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierrasse bzw. Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- nichttoxische Dosis, sofern möglich;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen (unter besonderer Berücksichtigung der klinischen Befunde);
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;

- 
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
  - klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnisse einer evtl. Urinanalyse);
  - Sektionsbefunde;
  - detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
  - statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
  - Diskussion der Ergebnisse;
  - Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH DERMALER APPLIKATION  
90-TAGE-TEST MIT NAGERN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird mehreren Versuchstiergruppen täglich in abgestuften Dosierungen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 90 Tagen. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezziert.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt. Kurz vor Beginn des Tests wird das Rückenfell der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch etwa 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Das Scheren oder Rasieren muß normalerweise wöchentlich wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, daß dabei die Haut nicht verletzt wird. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Bei der Bestimmung des zu scherenen Bereichs und der Applikationsfläche ist das Gewicht der Tiere zu berücksichtigen. Werden Versuche mit festen Stoffen durchgeführt, die ggf. pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder, falls erforderlich, mit einem geeigneten Vehikel angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut zu gewährleisten. Flüssige Prüfsubstanzen werden gewöhnlich unverdünnt angewendet. Die Applikation erfolgt normalerweise an fünf bis sieben Tagen pro Woche.

*Versuchsbedingungen*

*Versuchstiere*

Es können erwachsene Ratten, Kaninchen oder Meerschweinchen verwendet werden. Andere Tierarten sind ebenfalls geeignet, jedoch muß ihre Verwendung begründet werden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung im Körpergewicht nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische dermale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

*Anzahl und Geschlecht*

Mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) mit gesunder Haut sind für jede Dosierung zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 20 Tieren (10 Tiere pro Geschlecht) über 90 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden, um während eines Zeitraums von 28 Tagen nach der Behandlung auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen achten zu können.

### Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe und — sofern ein Vehikel benutzt wird — eine Vehikel-Kontrollgruppe erforderlich. Die Applikation der Prüfsubstanz sollte täglich zur gleichen Zeit und in festgesetzten Intervallen (wöchentlich oder vierzehntäglich) erfolgen, um ein in Relation zum Körpergewicht des Tieres konstantes Dosierungsniveau zu gewährleisten. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere.

Wird zur Erleichterung der Verabreichung ein Vehikel benutzt, so ist dieses der entsprechenden Kontrollgruppe in gleicher Weise zu verabreichen wie den behandelten Tieren und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Wirkungen eintreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so sollte die niedrigste Dosierung diesen Wert nicht überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Führt die Applikation der Prüfsubstanz zu schweren Hautreizungen, sollten die Konzentrationen herabgesetzt werden, was bei hoher Dosierung zu einer Verminderung oder einem Ausbleiben weiterer toxischer Wirkungen führen dürfte. Wurde die Haut stark beschädigt, ist es unter Umständen notwendig, den Versuch abzubrechen und mit einer niedrigeren Konzentration erneut zu beginnen.

### Limit-Test

Hat im Rahmen einer Vorstudie die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg bzw. einer höheren Dosis, die einer bekannten Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Auswirkungen, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich.

### Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

### Versuchsdurchführung

Die Tiere sind in Einzelkäfigen zu halten; die Prüfsubstanz wird ihnen vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche während eines Zeitraums von 90 Tagen verabreicht. Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 28 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen. Die Expositionszeit beträgt 6 Stunden pro Tag.

Die Prüfsubstanz ist gleichmäßig auf einen Bereich, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht, aufzutragen. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein, es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht bedeckt werden.

Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mittels eines porösen Mullverbandes und eines hautschonenden Pflasters in Kontakt mit der Haut zu halten. Die Versuchsfläche ist außerdem auf eine geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, daß die Tiere die Prüfsubstanz nicht verschlucken können. Zu diesem Zweck können ggf. Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden; eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen.

Nach Ablauf der Expositionszeit entfernt man — soweit möglich — den Rest der Prüfsubstanz mit Hilfe von Wasser oder eines anderen geeigneten Hautreinigungsverfahrens.

Alle Tiere müssen täglich beobachtet und Vergiftungssymptome sowie deren Beginn, Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futtermittelaufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Nach Abschluß der Studie werden alle überlebenden Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Satellitengruppe, seziert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

- a) eine ophthalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophthalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Gerätes sollte vor der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz und zum Abschluß der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen der Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen;

- b) am Ende des Versuches sind hämatologische Untersuchungen, einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differentialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl, durchzuführen;
- c) am Ende des Versuches sind ebenfalls klinisch-chemische Untersuchungen des Blutes durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen: Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose (mit auf die Tierart abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup>, Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>, Ornithin-Dekarboxylase, Gamma-Glutamyltranspeptidase, Harnstickstoff, Albumin, Blut-Kreatinin, Gesamtbilirubin- und -Serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren/Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen;
- d) in der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

Erweisen sich Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter vor Versuchsbeginn in Betracht gezogen werden.

#### Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen, einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen, sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren: alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von Trachea und Lungen, Herz, Aorta, (Speicheldrüse), Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, akzessorische Geschlechtsorgane, Gallenblase (sofern vorhanden), Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weibliche Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark (Augen), (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränendrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

#### Histopathologische Untersuchung

- a) Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung der behandelten und der unbehandelten Hautflächen sowie der Organe und Gewebe durchzuführen.
- b) Alle Organe mit makroskopischen Veränderungen sind zu untersuchen.
- c) Die Zielorgane der Tiere der anderen Dosisgruppen sind zu untersuchen.
- d) Werden Ratten benutzt, sind die Lungen der Tiere in der Gruppe mit niedriger und mittlerer Dosierung zur Feststellung einer möglichen Infektion histopathologisch zu untersuchen, daß eine geeignete Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere möglich ist. Weitere histopathologische Untersuchungen der Tiere dieser Gruppen sind routinemäßig nicht erforderlich, müssen jedoch bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung stets für alle geschädigten Organe durchgeführt werden.
- e) Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe histopathologisch zu untersuchen, die in den behandelten Gruppen auf die Prüfsubstanz reagierten.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderungen sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art der Veränderung, hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- nichttoxische Dosis, sofern möglich;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnis einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH INHALATION

## 90-TAGE-TEST MIT NAGERN

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Mehrere Versuchstiergruppen werden der Prüfsubstanz täglich über einen bestimmten Zeitraum in abgestuften Konzentrationen ausgesetzt, wobei für jede Gruppe eine Konzentration zu verwenden ist. Wird ein Vehikel beigegeben, um die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen, ist eine Vehikel-Kontrollgruppe einzusetzen. Während des Versuchszeitraumes werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziert.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt. Falls notwendig, kann der Prüfsubstanz ein geeignetes Vehikel beigegeben werden, um die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen. Wird zur Vereinfachung der Dosierung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz verwendet, muß dessen nichttoxische Wirkung gesichert sein. Dazu können gegebenenfalls Daten aus vorangegangenen Versuchen herangezogen werden.

*Versuchsbedingungen**Versuchstiere*

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, ist die Ratte zu bevorzugen. Es sind junge gesunde Tiere bekannter Versuchstierstämme zu verwenden. Die Schwankung im Körpergewicht sollte zu Beginn des Versuchs nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom anpassenden Mittelwert betragen. Wird eine subchronische Inhalationsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

*Anzahl und Geschlecht*

Mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) sind für jede Versuchsgruppe zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 20 Tieren (10 Tiere pro Geschlecht) über 90 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden, um während eines Zeitraums von 28 Tagen nach der Behandlung auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen achten zu können.

### Expositionskonzentration

Es sind mindestens drei Konzentrationen und eine Kontrollgruppe erforderlich; sofern ein Vehikel benutzt wird, ist eine zugehörige Kontrollgruppe (entsprechend der Konzentration des Vehikels bei der höchsten Expositions-konzentration) hinzuzuziehen. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Die höchste Konzentration ist so zu wählen, daß auf jeden Fall eine toxische Wirkung eintritt, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Konzentration darf keine Anzeichen von Toxizität verursachen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so muß die niedrigste Dosierung diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischenkonzentrationen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Konzentration sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

### Expositionszeit

Die tägliche Expositionszeit sollte sechs Stunden betragen, wobei eine ausgeglichene Verteilung der Kammerkonzentration gewährleistet sein muß. Bei spezifischen Erfordernissen sind auch andere Expositionszeiten möglich.

### Ausrüstung

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die einen dynamischen Luftstrom mit einem Luftwechsel von mindestens zwölfmal pro Stunde ermöglicht, um einen adequaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßig verteilte Expositionsatmosphäre zu gewährleisten. Wird eine Kammer verwendet, so ist sie so zu gestalten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden und die Exposition durch Inhalation der Prüfsubstanz maximiert wird. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das „Gesamtvolumen“ der Versuchstiere 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten. Möglich ist auch eine Exposition des Mund-Nasen-Bereichs, des Kopfes oder des ganzen Körpers in Inhalationskammern; der Vorteil der beiden ersten Expositionsarten besteht darin, die Aufnahme der Prüfsubstanz auf anderen Wegen einzuschränken.

### Beobachtungszeitraum

Die Versuchstiere sind während des gesamten Behandlungszeitraumes und der Erholungsphase täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

### Versuchsdurchführung

Die Tiere werden der Prüfsubstanz täglich an 5 bis 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 90 Tagen ausgesetzt. Die Tiere der Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 28 Tage ohne Exposition gehalten werden, um die Reversibilität der toxischen Wirkungen bzw. deren Fortbestehen feststellen zu können. Die Temperatur soll während des Versuchs  $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$  betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll zwischen 30 und 70 % liegen, was in einigen Fällen (z. B. Versuche mit Aerosolen) jedoch nicht durchführbar sein dürfte. Während der Exposition werden weder Futter noch Wasser verabreicht.

Es soll ein dynamisches Inhalationssystem mit einem geeigneten analytischen Verfahren zur Bestimmung der Konzentration benutzt werden. Um brauchbare Expositions-konzentrationen zu erhalten, wird ein Vorversuch empfohlen. Die Luftdurchflußrate ist so einzustellen, daß die Bedingungen in der gesamten Expositions-kammer einheitlich sind. Das System soll gewährleisten, daß konstante Expositionsbedingungen so schnell wie möglich erreicht werden.

Folgende Messungen oder Überwachungen sind durchzuführen:

- a) Luftdurchflußrate (kontinuierlich);
- b) die tatsächliche Konzentration der Prüfsubstanz wird im Atembereich gemessen. Während der täglichen Expositions-dauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  vom Mittelwert variieren. Bei Stäuben und einigen Aerosolen, wo dieser Wert nicht erreichbar ist, wird ein größerer Streubereich akzeptiert. Während der gesamten Versuchsdauer ist die Konzentration von Tag zu Tag so konstant wie möglich zu halten. Während des Versuchsaufbaus sollte eine Teilchengrößenanalyse durchgeführt werden, um die Konstanz der Aerosolkonzentrationen zu bestimmen. Während der Expositionszeit ist die Analyse so oft wie möglich zu wiederholen, um die Konstanz der Teilchengrößenverteilung zu kontrollieren.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
- d) während und nach der Exposition werden die Tiere beobachtet und die Befunde aufgezeichnet und im Bericht für jedes Tier festgehalten. Alle Tiere sollen täglich auf Anzeichen toxischer Effekte beobachtet und deren Auftreten, Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Menge des aufgenommenen Futters und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren

während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Nach Abschluß der Expositionsphase werden alle überlebenden Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Satellitengruppe, seziert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

- a) eine ophtalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophtalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Geräts sollte vor der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz und zum Abschluß der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen an den Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen.
- b) Am Ende des Versuches sind hämatologische Untersuchungen einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differenzialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl, durchzuführen.
- c) Am Ende des Versuches sind ebenfalls klinisch-chemische Analysen des Blutes durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen: Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose (mit auf die Tierart abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup>, Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>, Ornithin-Decarboxylase, Gamma-Glutamyl-transpeptidase, Harnstickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamtbilirubin- und -Serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren/Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen.
- d) In der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

Erweisen sich Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter vor Versuchsbeginn in Betracht gezogen werden.

#### Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen, einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren: alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Lungen, die vollständig und unversehrt entnommen, gewogen und mit einem geeigneten Fixiermittel konserviert werden, um die Lungenstruktur zu erhalten (als geeignetes Verfahren gilt die Perfusion der Lunge mit einer Fixierflüssigkeit), Gewebe von Nase und Pharynx, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von Trachea, Herz, Aorta, Speicheldrüse, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus (akzessorische Geschlechtsorgane), (Haut), Gallenblase (sofern vorhanden), Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weiblich Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems (Augen), Brustbein mit Knochenmark (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränendrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

#### Histopathologische Untersuchung

- a) Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung des Respirationstraktes sowie sonstiger Organe und Gewebe durchzuführen;
- b) alle Organe mit makroskopischen Veränderungen sind zu untersuchen;
- c) die Zielorgane der Tiere der anderen Dosisgruppen sind zu untersuchen;
- d) die Lungen der Tiere in der Gruppe mit niedriger und mittlerer Konzentration sind histopathologisch zu untersuchen, daß eine geeignete Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere möglich ist. Weitere histopathologische Untersuchungen der Tiere dieser Gruppen sind routinemäßig nicht erforderlich, müssen jedoch bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Konzentration stets für alle geschädigten Organe durchgeführt werden;
- e) bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe histopathologisch zu untersuchen, die in den behandelten Gruppen auf die Prüfsubstanz reagierten.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderung sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art der Veränderung, hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen:

*Beschreibung des Expositionsapparates:* einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in einer Versuchskammer. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und ggf. Konstanz der Aerosolkonzentration oder Teilchengröße sind zu beschreiben.

*Expositionsdaten:* Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
  - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
  - c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
  - d) ggf. Art des Vehikels;
  - e) tatsächliche Konzentrationen im Atembereich;
  - f) mittlere Teilchengrößen (sofern erforderlich).
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Konzentration;
  - nichttoxische Konzentration, sofern möglich;
  - Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
  - Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
  - Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
  - Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
  - ophthalmologische Befunde;
  - hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
  - klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnisse einer evtl. Urinanalyse);
  - Sektionsbefunde;
  - detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
  - statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
  - Diskussion der Ergebnisse;
  - Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**PRÜFUNG AUF TERATOGENITÄT****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen trächtiger Versuchstiere in abgestuften Dosierungen bzw. Konzentrationen in jeweils einer Dosierung je Gruppe verabreicht, und zwar mindestens während der gesamten Phase der Organogenese. Kurz vor dem erwarteten Geburtstermin wird das Muttertier getötet, der Uterus entnommen und der Inhalt untersucht. Dieses Prüfverfahren gilt für die embryonale und die fetale Toxizität.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode***Vorbereitung*

Gesunde, junge, ausgewachsene, virginelle weibliche Tiere vergleichbaren Alters und vergleichbarer Größe werden mindestens 5 Tage vor Testbeginn an die Laborbedingungen akklimatisiert und dann mit männlichen Tieren mit nachgewiesener Fruchtbarkeit gepaart. Die besamten Weibchen werden randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Paarung kann auf natürlichem Wege oder durch künstliche Befruchtung erfolgen.

Die Prüfsubstanz wird den weiblichen Tieren bald nach der Implantation und während der gesamten Phase der Organogenese täglich verabreicht. Einen Tag vor dem Geburtstermin werden die Feten durch Hysterektomie gewonnen und auf Organ- und Skelettenomalien einschließlich Wachstumshemmungen, verzögerte Knochenbildung und Hämorrhagien untersucht.

*Versuchsbedingungen***Versuchstiere**

Üblicherweise werden Ratte, Maus, Hamster und Kaninchen eingesetzt. Bevorzugte Tierarten sind Ratte und Kaninchen. Die Tests sind mit gebräuchlichen Versuchstierstämmen durchzuführen. Die verwendeten Tierstämme sollten eine ausreichende Fruchtbarkeit besitzen und ihre Empfindlichkeit gegen Teratogene bekannt sein. Die Tiere sind in Einzelkäfigen zu halten.

**Anzahl und Geschlecht**

Für jede Dosisgruppe sind mindestens 20 trächtige Ratten, Mäuse oder Hamster oder 12 trächtige Kaninchen erforderlich. Es muß gewährleistet sein, daß genügend Würfe und Jungtiere erzeugt werden, um eine Bewertung des teratogenen Potentials der Prüfsubstanz zu ermöglichen.

**Dosierungen**

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe zu verwenden. Wird die Prüfsubstanz über ein Vehikel verabreicht, so ist eine entsprechende Vehikel-Kontrollgruppe einzusetzen. Die toxischen Eigenschaften des Vehikel müssen bekannt sein; es sollte weder teratogen sein noch Auswirkungen auf die Reproduktion haben. Die Kontrollgruppe(n) ist (sind), abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz, in gleicher Weise zu behandeln

wie die Versuchsgruppen. Sofern die physikalisch-chemischen oder biologischen Eigenschaften der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosisgruppe möglichst so gewählt werden, daß zwar geringe Vergiftungserscheinungen beim Muttertier auftreten, wie z. B. geringfügiger Gewichtsverlust, die Anzahl der Todesfälle 10% jedoch nicht überschreitet. Die niedrigste Dosierung sollte keine erkennbaren, prüfsubstanzbedingten Wirkungen erzeugen. Die mittlere(n) Dosierung(en) sollte(n) das geometrische Mittel zwischen der höchsten und der schwächsten Dosierung bilden.

#### Limit-Test

Wenn sich im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität bei einer Dosierung von mindestens 1 000 mg/pro kg Körpergewicht keine embryonale Toxizität oder Teratogenität nachweisen läßt, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig.

#### Expositionszeit

Als Tag 0 des Versuchs gilt der Tag, an dem ein Vaginalpropf und/oder Sperma festgestellt wurde (sofern durchführbar). Die Behandlung soll während der Organogenese erfolgen. Dies sind bei der Ratte und der Maus Tag 6 bis 15 p.c., beim Hamster Tag 6 bis 14 p.c. und beim Kaninchen Tag 6 bis 18 p.c. Basiert die Festsetzung des Tages 0 auf der Beobachtung der Paarung bzw. der künstlichen Befruchtung, sind die oben genannten Daten durch Hinzufügung eines weiteren Tages zu korrigieren. Alternativ kann der Behandlungszeitraum bis etwa einen Tag vor dem erwarteten Geburtstermin ausgedehnt werden.

#### Beobachtungszeitraum

Mindestens einmal täglich sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung durchgeführt werden. Eine tägliche Beobachtung der Tiere ist außerdem erforderlich, um sicherzustellen, daß der Tierverlust während der Studie so gering wie möglich bleibt.

#### Verfahren

Die Prüfsubstanz wird oral mit der Magensonde, und zwar täglich etwa zur gleichen Zeit verabreicht.

Den weiblichen Versuchstieren wird die Prüfsubstanz während des Behandlungszeitraums täglich appliziert.

Bei der Bestimmung der Dosismenge legt man entweder das Ausgangsgewicht der weiblichen Tiere zugrunde oder — im Hinblick auf die schnelle Gewichtszunahme während der Gravidität — man bestimmt in periodischen Abständen das Körpergewicht der Tiere und legt die Dosismenge entsprechend fest. Vergiftungserscheinungen sowie deren Beginn, Grad und Dauer sind unmittelbar nach der Feststellung aufzuzeichnen. Muttertiere mit Anzeichen einer Fehlgeburt oder Frühgeburt müssen getötet und sorgfältig makroskopisch untersucht werden. Nach der Behandlung müssen die Tiere bis etwa einen Tag vor der Geburt beobachtet werden. Dies soll gewährleisten, daß zwar der Großteil der Trächtigkeit überwacht, die Bewertung der Ergebnisse jedoch nicht durch das Eintreten einer natürlichen Geburt beeinträchtigt werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des zentralen Nervensystems sowie auf Samotomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Menge des aufgenommenen Futters sollte wöchentlich bestimmt werden und das Gewicht der Tiere wird wöchentlich bestimmt.

#### Autopsie

Jedes Muttertier, das während oder nach Abschluß der Studie stirbt, sollte makroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen untersucht werden, die möglicherweise Einfluß auf die Trächtigkeit hatten. Unmittelbar nach dem Tod ist der Uterus zu entnehmen und auf tote Embryonen oder Feten bzw. auf die Anzahl der lebenden Feten zu untersuchen. Normalerweise ist es möglich, den Zeitpunkt des intrauterinen Fruchttodes abzuschätzen. Bei Ratten und Kaninchen kann die Anzahl der *corpora lutea* bestimmt werden.

Das Geschlecht der Feten muß bestimmt, das individuelle Körpergewicht ermittelt und aufgezeichnet und das mittlere Fetalgewicht daraus berechnet werden. Außerdem muß jeder Fetus nach der Entnahme aus dem Uterus äußerlich untersucht werden. Bei Ratten, Mäusen und Hamstern wird ein Drittel, maximal die Hälfte jedes Wurfs präpariert und auf Skelettanomalien untersucht, der andere Teil des Wurfs wird mit Hilfe geeigneter Untersuchungsmethoden auf Anomalien der Weichteile analysiert. Bei Kaninchen wird jeder Fetus anhand einer sorgfältigen Autopsie auf viszerale und anschließend auf Skelettfehlbildungen untersucht.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, Anzahl der Tiere, die trächtig wurden, Anzahl und Prozentsatz der Lebendgeburten und der Feten mit Weichteil- oder Skelett-Fehlbildungen in Relation zum jeweiligen Wurf. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### 3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel, sofern verwendet) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Dosierung;
- nichttoxische Dosierung (sofern möglich);
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- Dauer der Trächtigkeit, Angaben über den Wurf (einschließlich historischer Daten);
- Daten über die Feten (Lebend- und/oder Totgeburten, Geschlecht, Weichteil- und Skelettfehlbildungen);
- Daten über den Wurf (Lebend- und/oder Totgeburten, Geschlecht, Weichteil- und Skelettfehlbildungen für jeden Wurf);
- statistische Auswertung der Ergebnisse;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

#### 3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

### 4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## PRÜFUNG AUF CHRONISCHE TOXIZITÄT

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird normalerweise für einen größeren Teil der Lebensdauer den Versuchstiergruppen an 7 Tagen pro Woche auf einem geeigneten Verabreichungsweg appliziert, und zwar jeweils eine Dosierung je Gruppe. Während und nach der Exposition werden die Versuchstiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Anzahl von Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

*Versuchsbedingungen**Versuchstiere*

Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Auf der Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Studien können jedoch andere Tierarten (Nager oder Nichtnager) verwendet werden. Die Tests sind mit jungen gesunden Tieren gebräuchlicher Versuchstierstämme durchzuführen; mit der Verabreichung der Prüfsubstanz sollte in einem geeigneten Zeitraum nach der Entwöhnung vom Muttertier begonnen werden.

Bei Versuchsbeginn sollte die Variabilität des Körpergewichtes der Tiere nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

*Anzahl und Geschlecht*

Bei Nagern sollten mindestens 40 Tiere (20 weibliche und 20 männliche) für jede Dosierung und die entsprechende Kontrollgruppe verwendet werden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen.

Bei Nichtnagern ist eine geringerer Anzahl an Tieren, mindestens jedoch 4 pro Geschlecht und Dosisgruppe zulässig.

*Dosierungen und Expositionshäufigkeit*

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe zu verwenden. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Wirkungen auftreten, jedoch keine übermäßig hohe Todesrate eintritt. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Die mittlere Dosierung liegt zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung.

Bei der Auswahl der Dosierungen sind Daten aus vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen.

Normalerweise erfolgt die Exposition täglich. Wird die Substanz im Trinkwasser verabreicht oder mit dem Futter vermischt, müssen Wasser bzw. Futter den Tieren jederzeit zugänglich sein.

#### Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe muß, abgesehen von der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz, in jeder Hinsicht den Versuchstiergruppen entsprechen.

Unter besonderen Bedingungen, wie z. B. bei Verwendung eines Aerosols bei Inhalationsstudien oder eines Emulgators mit unbekannter biologischer Wirkung bei oralen Toxizitätsstudien, empfiehlt sich der Einsatz einer zusätzlichen unbehandelten Kontrollgruppe. Diese Gruppe wird in gleicher Weise behandelt wie alle übrigen Versuchstiere, darf jedoch weder der Prüfsubstanz noch irgendeines Vehikels gegenüber exponiert werden.

#### Verabreichungsweg

Es finden in der Hauptsache die orale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungsweges hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der voraussichtlichen Art der Exposition beim Menschen ab.

Der dermale Verabreichungsweg wirft erhebliche praktische Probleme auf. Eine chronische systematische Toxizität als Folge einer perkutanen Absorption läßt sich normalerweise aus den Ergebnissen der oralen Toxizitätsstudie und der Kenntnis über den aus vorangegangenen perkutanen Toxizitätsbestimmungen ermittelten Umfang der perkutanen Absorption ableiten.

#### Orale Applikation

Wird die Prüfsubstanz vom Magen-Darm-Trakt absorbiert und ist eine Exposition beim Menschen auf oralem Wege möglich, sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, der orale Verabreichungsweg gewählt werden. Den Tieren sollte die Prüfsubstanz im Futter, gelöst im Trinkwasser oder in Kapseln zugeführt werden.

Wünschenswert ist eine tägliche Verabreichung an sieben Tagen pro Woche, da bei einem fünftägigen Rhythmus die verabreichungsfreie Zeit eine Erholung bzw. einen Rückgang von Vergiftungserscheinungen ermöglicht und so das Ergebnis und die Bewertung beeinflussen kann. Aus praktischen Überlegungen ist jedoch ein fünftägiger Verabreichungsrhythmus als annehmbar zu betrachten.

#### Inhalative Applikation

Da Studien über die inhalative Applikation im Vergleich zu den sonstigen Verabreichungswegen größere technische Probleme aufwerfen, soll hier eine ausführlichere Anleitung gegeben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die intratracheale Instillation in besonderen Fällen durchaus eine gültige Alternative darstellt.

Bei langfristigen Expositionen legt man üblicherweise entweder eine angenommene Exposition beim Menschen zugrunde, wobei die Tiere bei einheitlicher Testkammerkonzentration 5 Tage lang täglich 6 Stunden exponiert werden (intermittierende Exposition). Oder man geht von einer möglichen Umweltexposition aus, bei der die Tiere an 7 Tagen jeweils 22 bis 24 Stunden der Prüfsubstanz ausgesetzt sind (kontinuierliche Exposition) und wobei pro Tag jeweils zur gleichen Zeit eine Stunde zur Fütterung und Wartung der Kammer vorgesehen ist.

In beiden Fällen werden die Tiere normalerweise einer festgesetzten Konzentration der Prüfsubstanz ausgesetzt. Der Hauptunterschied, der zwischen der intermittierenden und der kontinuierlichen Exposition zu berücksichtigen ist, liegt darin, daß sich die Tiere im ersteren Falle während einer 17 bis 18stündigen expositionsfreien Periode und während des noch längeren Zeitraums am Wochenende möglicherweise von den Auswirkungen der täglichen Exposition erholen.

Welche der beiden Expositionsformen gewählt wird, hängt von den Zielsetzungen der jeweiligen Studie sowie von den beim Menschen gegebenen Voraussetzungen ab, die mit dem Test simuliert werden sollen. Einige technische Schwierigkeiten müssen jedoch berücksichtigt werden. So dürfte z. B. der Vorteil der kontinuierlichen Exposition bei der Simulierung von Umgebungsbedingungen sowohl durch die Notwendigkeit aufgehoben werden, die Tiere mit Wasser und Futter zu versorgen als auch durch den Bedarf an besser entwickelten (und zuverlässigeren) Aerosol sowie Dampferzeugungs- und Überwachungstechniken zu warten.

#### Expositionskammern

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die eine dynamische Luftgeschwindigkeit mit einer Luftwechselrate von mindestens 12 mal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz in der Atmosphäre zu gewährleisten. Die Testkammern für die Kontroll- wie für die Versuchstiere sollten in Konzeption und Ausführung identisch sein, um in jeder Hinsicht — mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz — vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen. Üblicherweise wird in der Testkammer ein geringer Unterdruck erzeugt, um ein Entweichen der Prüfsubstanz aus der Kammer zu vermeiden. Die Testkammern sollten gewährleisten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere grundsätzlich 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten.

Folgende Messungen oder Kontrollen sind durchzuführen:

- a) Luftströmung: die Luftdurchflußrate innerhalb der Testkammer sollte vorzugsweise kontinuierlich überwacht werden;
- b) Während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  des Mittelwerts variieren.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit: Bei Nagern soll die Temperatur  $22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) betragen und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zwischen 30 und 70 % liegen, es sei denn, die Prüfsubstanz wird mit Hilfe von Wasser in der Testkammer suspendiert. Es empfiehlt sich, beide Größen kontinuierlich zu überwachen.
- d) Teilchengrößenmessungen: Sowohl für Flüssig- als auch für Feststoffaerosole ist eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilung in der Kammeratmosphäre vorzunehmen. Die Aerosolteilchen müssen für die Versuchstiere lungengängig sein. Stichproben sind in der Atemzone der Tiere zu entnehmen. Sie müssen repräsentativ für die Teilchenverteilung sein, der die Tiere ausgesetzt sind und sollten außerdem alle suspendierten Aerosole, auch wenn sie zum Großteil nicht lungengängig sind, gravimetrisch erfassen. Beim Aufbau der Versuchsanlage muß die Teilchengröße-Analyse so oft wie nötig wiederholt werden, um die Stabilität der Aerosolkonzentration zu gewährleisten. Während der folgenden Expositionen ist eine Wiederholung nur so oft erforderlich, wie es für eine angemessene Bestimmung der Konsistenz der Teilchenverteilung, der die Tiere ausgesetzt waren, notwendig ist.

#### Versuchsdauer

Der Verabreichungszeitraum sollte mindestens 12 Monate betragen.

#### Verfahren

##### Beobachtungen

Mindestens einmal am Tag ist eine sorgfältige klinische Untersuchung vorzunehmen. Eine zusätzliche tägliche Beobachtung der Tiere ist außerdem erforderlich, um sicherzustellen, daß der Tierversuch so gering wie möglich bleibt, z. B. durch Autopsie oder Kühlung der tot aufgefundenen Tiere sowie durch Isolierung oder Tötung schwacher bzw. kranker Tiere. Eine sorgfältige Beobachtung ist angezeigt, um den Beginn und die Weiterentwicklung von Vergiftungserscheinungen festzustellen und um Verluste des Tierbestandes aufgrund von Krankheiten, Autolyse oder Kannibalismus weitestgehend einschränken zu können.

Klinische Symptome, einschließlich neurologischer und Augenveränderungen sowie Mortalität sind für alle Tiere aufzuzeichnen. Der Zeitpunkt des Auftretens und der Weiterentwicklung des toxischen Zustandes, einschließlich der Bildung verdächtiger Tumoren, ist ebenfalls festzuhalten.

Das Körpergewicht jedes Einzeltieres ist während der ersten dreizehn Wochen des Tests einmal wöchentlich und anschließend mindestens einmal alle vier Wochen festzustellen. Die Nahrungsaufnahme wird während der ersten 13 Wochen der Studie und anschließend in etwa dreimonatigen Abständen bestimmt, sofern nicht der Gesundheitszustand oder das Körpergewicht der Tiere andere Maßnahmen erforderlich machen.

##### Hämatologische Untersuchung

Eine hämatologische Untersuchung (z. B. Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Gesamtzahl der roten Blutkörperchen, Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen, Blutplättchen oder sonstige Messungen der Gerinnungsfähigkeit) anhand der Blutproben von allen Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen sollte nach 3 Monaten, nach 6 Monaten und anschließend in etwa sechsmonatigen Abständen sowie nach Abschluß der Studie durchgeführt werden. Sofern durchführbar, sollten diese Blutproben bei jeder Untersuchung von den gleichen Ratten stammen. Zusätzlich ist Nichtnagern vor Beginn des Versuchs eine Blutprobe zu entnehmen.

Läßt die klinische Beobachtung auf eine Verschlechterung des Gesundheitszustands der Tiere im Verlauf der Studie schließen, kann ein Differentialblutbild der erkrankten Tiere erstellt werden.

Das Differentialblutbild wird aus den Blutproben von Tieren der höchsten Dosisgruppe und von Tieren der Kontrollgruppe erstellt. Für die Tiere der niedrigeren Dosisgruppe(n) ist die Erstellung eines Differentialblutbildes nur erforderlich, wenn zwischen der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe erhebliche Abweichungen bestehen oder wenn die pathologische Untersuchung dies nahelegt.

##### Urinanalyse

Urinproben sind von den Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht von allen Dosisgruppen möglichst in den gleichen zeitlichen Abständen wie bei der vorstehend beschriebenen hämatologischen Untersuchung zu entnehmen. Bei Nagern sollten die folgenden Analysen entweder von jedem Einzeltier oder auf der Grundlage einer Sammelprobe Geschlecht/Gruppe durchgeführt werden:

- Aussehen: Volumen und spezifisches Gewicht für jedes Einzeltier;

- Protein, Glukose, Ketone, Blut (semiquantitativ);
- Urinsediment (semiquantitativ).

#### Klinische Chemie

In etwa halbjährlichen Abständen und bei Abschluß der Untersuchung werden von allen Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen — wenn möglich jeweils von den gleichen Ratten — Blutproben zu klinisch-chemischen Messungen entnommen.

Zusätzlich sollte vor dem Versuch von allen Nichtnagern eine Blutprobe entnommen werden. Mit dem aus diesen Proben gewonnenen Plasma werden folgende Analysen durchgeführt:

- Gesamtproteinkonzentration;
- Albuminkonzentration;
- Leberfunktionstests (wie alkalische Phosphatase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup> und Glutamat-Oxalazetat-Transaminase <sup>(2)</sup>), Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, Ornithin-Decarboxylase;
- Kohlenhydratstoffwechsel, z. B. Nüchternglukose;
- Nierenfunktionstest, z. B. Harnstickstoff im Blut.

#### Autopsie

An allen Tieren, einschließlich der während des Versuchs gestorbenen bzw. aus Krankheitsgründen getöteten Tiere, wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Zuvor sollten von allen Tieren Blutproben zur Erstellung eines Differentialblutbildes entnommen werden. Alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Tumoren oder tumorverdächtige Veränderungen müssen fixiert werden. Man sollte versuchen, die Beobachtungen der Autopsiebefunde mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung zu korrelieren.

Alle Organe und Gewebe sind für die mikroskopische Untersuchung zu fixieren. Hierzu zählen gewöhnlich folgende Organe und Gewebe: Gehirn <sup>(3)</sup> (Medulla/Pons, Kleinhirn- und Großhirnrinde), Hypophyse, Schilddrüse (einschließlich Nebenschilddrüse), Thymus, Lungen (einschließlich Trachea), Herz, Aorta, Speicheldrüse, Leber <sup>(3)</sup>, Milz, Nieren <sup>(3)</sup>, Nebennieren <sup>(3)</sup>, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon, Rektum, Uterus, Harnblase, Lymphknoten, Pankreas, Gonaden <sup>(3)</sup>, akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüse, Haut, Muskulatur, Nerven des peripheren Systems, Wirbelsäule (Hals-, Thorax-, Lendenbereich), Brustbein mit Knochenmark und Femur (einschließlich Gelenk) und Augen. Die Instillierung der Lungen und der Harnblase mit Fixierlösung stellt die optimale Konservierung dieser Gewebe dar; bei Inhalationsstudien ist eine derartige Aufblähung der Lungen Voraussetzung zur Durchführung einer geeigneten histopathologischen Untersuchung. Bei Spezialuntersuchungen wie Inhalationsstudien muß der gesamte Respirationstrakt, einschließlich Nase, Pharynx und Larynx untersucht werden.

Werden sonstige klinische Untersuchungen durchgeführt, sollten die daraus gewonnenen Ergebnisse vor der mikroskopischen Untersuchung vorliegen, da sie dem Pathologen wichtige Hinweise geben können.

#### Histopathologie

Alle sichtbaren Veränderungen, insbesondere Tumoren oder sonstige Veränderungen an Organen, sind mikroskopisch zu untersuchen. Zusätzlich werden folgende Verfahren empfohlen:

- a) Mikroskopische Untersuchung aller fixierten Organe und Gewebe mit vollständiger Beschreibung aller nachgewiesenen Veränderungen bei:
  1. allen Tieren, die im Verlauf der Studie starben oder getötet wurden und
  2. alle Tiere aus der höchsten Dosisgruppe und aus den Kontrollgruppen;
- b) in den niedrigeren Dosisgruppen sind auch die Organe und Gewebe zu untersuchen, welche Veränderungen aufweisen, die eindeutig oder möglicherweise auf die Prüfsubstanz zurückzuführen sind;
- c) wenn die Ergebnisse des Versuchs zeigen, daß die normale Lebensdauer des Tieres wesentlich beeinflusst wird oder daß es zu Folgeerscheinungen kommt, die die toxische Reaktion beeinflussen, muß die nächstniedrigere Dosisgruppe in der zuvor beschriebenen Weise untersucht werden;
- d) Information über die Häufigkeit wie Spontanveränderungen, die normalerweise innerhalb des Bestands der benutzten Tiere (unter identischen Laborbedingungen, d. h. unter Berücksichtigung historischer Kontrollen) auftreten, ist für eine korrekte Bewertung der Signifikanz der bei den exponierten Tieren beobachteten Veränderungen unerlässlich.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(3)</sup> Diese Organe, entnommen von zehn Tieren pro Geschlecht/Gruppe der Nager und von allen Nichtnagern, einschließlich der Schilddrüse (mit Nebenschilddrüse) von allen Nichtnagern, sind außerdem zu wiegen.

**2. DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderungen sowie der Prozentsatz der Tiere pro Veränderung hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen:

Beschreibung des Expositionsapparates:

einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in der Versuchskammer während der Durchführung der Versuche. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gegebenenfalls Stabilität der Aerosolkonzentration oder der Teilchengröße sind zu beschreiben.

Expositionsdaten:

Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
- b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
- c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
- d) gegebenenfalls Art des Vehikels;
- e) tatsächliche Konzentration im Atembereich;
- f) mittlere Teilchengröße (sofern erforderlich);
- Dosierungen (gegebenenfalls Vehikel, sofern benutzt) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- nichttoxische Dosis;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuches bzw. Angabe, ob die Tiere bis zum Abschluß des Versuchs überlebten;
- Beschreibung toxischer und anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnisse einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**PRÜFUNG AUF KANZEROGENITÄT****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird normalerweise für einen größeren Teil der Lebensdauer den Versuchstiergruppen an 7 Tagen pro Woche auf einem geeigneten Verabreichungsweg appliziert, und zwar jeweils eine Dosierung je Gruppe. Während und nach der Exposition werden die Versuchstiere täglich auf Vergiftungserscheinungen, insbesondere auf die Entwicklung von Tumoren, beobachtet.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Anzahl von Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

**Versuchstiere**

Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Auf der Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Studien können jedoch auch andere Tierarten (Nager oder Nichtnager) verwendet werden. Die Tests sind mit jungen gesunden Tieren gebräuchlicher Versuchstierstämme durchzuführen; mit der Verabreichung der Prüfsubstanz sollte in einem geeigneten Zeitraum nach der Entwöhnung vom Muttertier begonnen werden.

Bei Versuchsbeginn sollte die Variabilität des Körpergewichtes der Tiere nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsbestimmung einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

**Anzahl und Geschlecht**

Bei Nagern sind mindestens 100 Tiere (50 weibliche und 50 männliche) für jede Dosierung und die entsprechende Kontrollgruppe zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen.

**Dosierungen und Expositionshäufigkeit**

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine zusätzliche Kontrollgruppe zu verwenden. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß nur geringgradige Vergiftungserscheinungen auftreten, wie etwa eine verzögerte Körpergewichtsentwicklung (weniger als 10%). Die normale Lebensdauer der Tiere sollte jedoch nicht durch andere als durch tumorbedingte Folgeerscheinungen beeinträchtigt werden.

Die niedrigste Dosierung sollte den normalen Verlauf von Wachstum und Entwicklung sowie die Lebensdauer der Tiere nicht beeinträchtigen und keinerlei Anzeichen einer toxischen Wirkung hervorrufen. Sie sollte normalerweise nicht weniger als 10 Prozent der höchsten Dosierung betragen.

Die mittlere Dosierung liegt zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung.

Bei der Auswahl der Dosierungen sind Daten aus vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen.

Die Exposition erfolgt normalerweise täglich. Wird die Substanz im Trinkwasser verabreicht oder mit dem Futter vermischt, müssen Wasser bzw. Futter den Tieren jederzeit zugänglich sein.

#### Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe muß, abgesehen von der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz, in jeder Hinsicht den Versuchstiergruppen entsprechen.

Unter besonderen Bedingungen, wie z. B. bei Verwendung eines Aerosols bei Inhalationsstudien oder eines Emulgators mit unbekannter biologischer Wirkung bei oralen Toxizitätsstudien empfiehlt sich der Einsatz einer zusätzlichen unbehandelten Kontrollgruppe, der das Vehikel nicht appliziert werden darf.

#### Verabreichungsweg

In der Hauptsache finden die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungsweges hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der Art der Exposition beim Menschen ab.

##### Orale Applikation

Wird die Prüfsubstanz vom Magen-Darm-Trakt absorbiert und ist eine Exposition beim Menschen auf oralem Weg möglich, sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, der orale Verabreichungsweg gewählt werden. Den Tieren sollte die Prüfsubstanz im Futter, gelöst im Trinkwasser oder in Kapseln zugeführt werden.

Wünschenswert ist eine tägliche Verabreichung an 7 Wochentagen, da bei einem fünftägigen Rhythmus während der verabreichungsfreien Zeit eine Erholung oder ein Rückgang von Vergiftungserscheinungen möglich ist und so das Ergebnis und die Bewertung beeinflussen kann. Aus praktischen Überlegungen ist jedoch ein fünftägiger Verabreichungsrhythmus als annehmbar zu betrachten.

##### Dermale Applikation

Die kutane Exposition durch Auftragen auf die Haut kann gewählt werden, um eine der wichtigen Expositionsarten beim Menschen zu simulieren; sie dient gleichzeitig als Modell für die Induzierung von Hautveränderungen.

##### Inhalative Applikation

Da Studien über die inhalative Applikation im Vergleich zu den sonstigen Verabreichungswegen größere technische Probleme aufwerfen, soll hier eine ausführlichere Anleitung gegeben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die intratracheale Instillation in besonderen Fällen durchaus eine gültige Alternative darstellt.

Bei langfristigen Expositionen legt man üblicherweise entweder eine angenommene Exposition beim Menschen zugrunde, wonach die Tiere bei einheitlicher Testkammerkonzentration 5 Tage lang täglich 6 Stunden exponiert werden (intermittierende Exposition). Oder man geht von einer möglichen Umweltexposition aus, bei der die Tiere an 7 Tagen jeweils 22 bis 24 Stunden der Prüfsubstanz ausgesetzt sind (kontinuierliche Exposition) und pro Tag jeweils zur gleichen Zeit eine Stunde zur Fütterung und zur Wartung der Kammer vorgesehen ist. In beiden Fällen werden die Tiere normalerweise einer festgesetzten Konzentration der Prüfsubstanz ausgesetzt. Der Hauptunterschied, der zwischen der intermittierenden und der kontinuierlichen Exposition zu berücksichtigen ist, liegt darin, daß sich im ersten Falle die Tiere während einer 17- bis 18stündigen expositionsfreien Periode und während des noch längeren Zeitraums am Wochenende möglicherweise von den Auswirkungen der täglichen Exposition erholen.

Welche der beiden Expositionsformen gewählt wird, hängt von den Zielsetzungen der jeweiligen Studie sowie von den beim Menschen gegebenen Voraussetzungen ab, die mit dem Test simuliert werden sollen. Einige technische Schwierigkeiten müssen jedoch berücksichtigt werden. So dürfte z. B. der Vorteil der kontinuierlichen Exposition bei der Simulation von Umgebungsbedingungen sowohl durch die Notwendigkeit aufgehoben werden, die Tiere mit Wasser und Futter zu versorgen als auch durch den Bedarf an besser entwickelten (und zuverlässigeren) Aerosol- sowie Dampferzeugungs- und Überwachungstechniken zu warten.

#### Expositionskammern

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die eine dynamische Luftgeschwindigkeit mit einer Luftwechselrate von mindestens zwölfmal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz in der Atmosphäre zu gewährleisten. Die Testkammern für die Kontroll- wie für die Versuchstiere sollten in Konzeption und Ausführung identisch sein, um in jeder Hinsicht — mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz — vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen.

Üblicherweise wird in der Testkammer ein geringer Unterdruck erzeugt, um ein Entweichen der Prüfsubstanz aus der Kammer zu vermeiden. Die Testkammern sollten gewährleisten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das Gesamtvolumen der Versuchstiere 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten.

Folgende Messungen oder Kontrollen sind durchzuführen:

- a) Luftströmung: die Luftdurchflußrate innerhalb der Testkammer sollte vorzugsweise kontinuierlich überwacht werden.
- b) Während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  des Mittelwertes variieren.

Während der gesamten Versuchsdauer ist die tägliche Konzentration so konstant wie möglich zu halten.

- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit: Bei Nagern soll die Temperatur  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) betragen und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zwischen 30 und 70 % liegen, es sei denn, die Prüfsubstanz wird mit Hilfe von Wasser in der Testkammer suspendiert. Es empfiehlt sich, beide Größen kontinuierlich zu überwachen.
- d) Teilchengrößenmessungen: Sowohl für Flüssig- als auch für Feststoffaerosole ist eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilung in der Kammeratmosphäre vorzunehmen. Die Aerosolteilchen müssen für die Versuchstiere lungengängig sein. Stichproben sind in der Atemzone der Tiere zu entnehmen. Diese Stichproben müssen repräsentativ für die Teilchenverteilung sein, der die Tiere ausgesetzt sind und sollten außerdem alle suspendierten Aerosole, auch wenn sie zum Großteil nicht lungengängig sind, gravimetrisch erfassen. Beim Aufbau der Versuchsanlage muß die Teilchengröße-Analyse so oft wie nötig wiederholt werden, um die Stabilität der Aerosolkonzentration zu gewährleisten. Während der folgenden Expositionen ist eine Wiederholung nur so oft erforderlich, wie es für eine angemessene Bestimmung der Konsistenz der Teilchenverteilung, der die Tiere ausgesetzt wurden, notwendig ist.

#### Versuchsdauer

Die Dauer der Karcinogenitätsstudie umfaßt den größten Teil der Lebensdauer der Versuchstiere. Bei Mäusen und Hamstern sollte die Studie nach 18 Monaten, bei Ratten nach 24 Monaten abgeschlossen werden; bei bestimmten Tierstämmen mit längerer Lebensdauer und/oder geringer spontaner Tumorrates sollte die Studie jedoch erst nach 24 Monaten (Mäuse und Hamster) bzw. 30 Monaten (Ratten) beendet werden. Andererseits ist es vertretbar, eine derart verlängerte Studie dann abzuschließen, wenn die Überlebensrate in der niedrigsten Dosisgruppe oder der Kontrollgruppe 25 % erreicht. Ist ein offensichtlich geschlechtsspezifischer Unterschied in der Reaktion erkennbar, sollten im Hinblick auf den Abschluß der Studie die Versuchstiere in nach Geschlechtern getrennte Gruppen aufgeteilt und gesondert berücksichtigt werden. Ist allein in der hohen Dosisgruppe eine offensichtlich auf die toxische Wirkung zurückzuführende, vorzeitige hohe Sterberate festzustellen, muß dies nicht zwangsläufig den Abschluß der Studie zur Folge haben, vorausgesetzt, die toxische Wirkung wirkt in den anderen Dosisgruppen keine schwerwiegenden Probleme auf. Von einem negativen Testergebnis kann nur dann ausgegangen werden, wenn sich der Bestand der Tiere in jeder Gruppe durch Autolyse, Kannibalismus oder durch labortechnische Probleme um nicht mehr als 10 % verringert und bei einer 18monatigen (Mäuse und Hamster) bzw. 24monatigen Studiendauer (Ratten) die Überlebensrate in allen Gruppen nicht unter 50 % liegt.

#### Verfahren

##### Beobachtungen

Bei der täglichen Beobachtung der Tiere sollte insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des Zentralnervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster geachtet werden.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist notwendig, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziiert werden.

Klinische Symptome und Mortalität sind für jedes Tier aufzuzeichnen. Die Entwicklung von Tumoren ist mit besonderer Aufmerksamkeit zu verfolgen, dabei sind der Zeitpunkt der Entstehung, die Lokalisierung, das Ausmaß, das Erscheinungsbild und die Progression jedes deutlich sichtbaren oder fühlbaren Tumors festzuhalten.

Die Nahrungsaufnahme (und der Wasserverbrauch, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird) sind während der ersten 13 Wochen der Studie wöchentlich und anschließend in dreimonatigen Abständen zu bestimmen, sofern der Gesundheitszustand oder das Körpergewicht der Tiere nicht andere Maßnahmen erfordern.

Das Körpergewicht jedes Einzeltieres ist während der ersten dreizehn Wochen des Tests einmal wöchentlich und anschließend mindestens einmal alle vier Wochen aufzuzeichnen.

### *Klinische Untersuchungen*

#### Hämatologie

Läßt die Beobachtung der Tiere auf eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes im Verlauf der Studie schließen, ist ein Differentialblutbild der erkrankten Tiere zu erstellen.

Nach 12 Monaten, 18 Monaten und vor der Tötung wird von allen Tieren ein Blutausschrieb angefertigt. Ein Differentialblutbild wird von Tieren der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe erstellt. Wenn es die Ergebnisse aus dieser, insbesondere jedoch aus der letzten, vor der Tötung vorgenommenen Analyse oder die Daten aus pathologischen Untersuchungen angezeigt erscheinen lassen, ist auch für die nächstniedrigere(n) Gruppe(n) ein Differentialblutbild anzufertigen.

#### Autopsie

An allen Tieren, einschließlich der während des Versuchs gestorbenen bzw. aus Krankheitsgründen getöteten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Alle erkennbaren Tumore oder Gewebe mit tumorverdächtigen Veränderungen müssen asserviert werden.

Die folgenden Organe und Gewebe sind in einem geeigneten Medium für eine etwaige spätere histopathologische Untersuchung zu asservieren: alle auffälligen Veränderungen, Gehirn — einschließlich Gewebsschnitte von Medulla/Pons, Kleinhirn- und Großhirnrinde, Hypophyse, Schilddrüse/Nebenschilddrüse, Thymusgewebe, Trachea und Lungen, Herz, Aorta, Speicheldrüsen, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, sonstige Geschlechtsorgane, Haut, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Rektum, Blase, repräsentative Lymphknoten, weibliche Brustdrüse, Oberschenkelmuskulatur, Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark, Femur — einschließlich Gelenkoberfläche, Wirbelsäule, Hals, Thorax- und Lendenbereich, Augen.

Die Instillierung der Lungen und der Harnblase mit Fixierlösung stellt die optimale Konservierung dieser Gewebe dar; bei Inhalationsstudien ist eine derartige Fixierungsmethode der Lungen Voraussetzung für eine optimale histopathologische Untersuchung. Bei Inhalationsstudien muß der gesamte Respirationstrakt, einschließlich Nase, Pharynx und Larynx asserviert werden.

#### Histopathologie

- a) Die Organe aller Tiere, die während des Tests sterben bzw. getötet werden sowie aller Tiere der Kontrollgruppen und der hohen Dosisgruppen werden einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen;
- b) alle Tumoren oder tumorverdächtigen Veränderungen in allen Gruppen;
- c) besteht zwischen der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit neoplastischer Veränderungen, sollte das betreffende Organ bzw. Gewebe auch in den anderen Dosisgruppen einer histopathologischen Untersuchung unterzogen werden;
- d) ist die Überlebensrate in der höchsten Dosisgruppe wesentlich geringer als in der Kontrollgruppe, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen;
- e) lassen sich in der höchsten Dosisgruppe toxische Wirkungen nachweisen, die gegebenenfalls Einfluß auf die Tumorentwicklung haben, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit während des Tests festgestellten Tumoren, der Zeitpunkt der Feststellung und die Anzahl der Tiere, bei denen nach der Autopsie ein Tumor nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu kann eine anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung.

— Versuchsbedingungen:

Beschreibung des Expositionsapparates

einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in der Versuchskammer während der Durchführung der Versuche. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gegebenenfalls Stabilität der Aerosolkonzentration oder der Teilchengröße sind zu beschreiben.

Expositionsdaten

Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankungen (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
  - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
  - c) nominale Konzentrationen (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
  - d) gegebenenfalls Art des Vehikels;
  - e) tatsächliche Konzentration im Atembereich;
  - f) mittlere Teilchengröße (sofern erforderlich);
- Dosierungen (gegebenenfalls Vehikel, sofern benutzt) und Konzentrationen;
- Daten über die Häufigkeit von Tumoren, gegliedert nach Geschlecht, Dosierung und Art des Tumors;
- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zum Abschluß des Versuchs überleben;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse mit Beschreibung des angewandten Verfahrens;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**KOMBINIERTE STUDIE ZUR PRÜFUNG AUF KANZEROGENITÄT UND CHRONISCHE TOXIZITÄT****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Das Ziel einer kombinierten Toxizitäts-Kanzerogenitätsbestimmung liegt in der Ermittlung der chronischen und kanzerogenen Wirkungen, die eine Substanz nach langdauernder Exposition bei einem Säugetier hervorruft.

Aus diesem Grund wird die Kanzerogenitätsstudie um mindestens eine zusätzliche behandelte Satellitengruppe und eine Kontroll-Satellitengruppe erweitert. Die Dosis der behandelten Satellitengruppe kann höher liegen als die höchste Dosis für den Kanzerogenitätsversuch. Die Versuchstiere der Kanzerogenitätsstudie werden auf allgemeinen Vergiftungserscheinungen und Tumoren untersucht, die Tiere in der behandelten Satellitengruppe auf allgemeine Vergiftungserscheinungen.

Die Prüfsubstanz wird normalerweise für einen größeren Teil der Lebensdauer den Versuchstiergruppen an sieben Tagen pro Woche auf einem geeigneten Verabreichungsweg appliziert, und zwar jeweils eine Dosierung je Gruppe. Während und nach der Exposition werden die Versuchstiere täglich auf Vergiftungserscheinungen, insbesondere auf die Entwicklung von Tumoren, beobachtet.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Anzahl von Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

**Versuchstiere**

Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Auf der Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Studien können jedoch auch andere Tierarten (Nager oder Nichtnager) verwendet werden. Die Tests sind mit jungen gesunden Tieren gebräuchlicher Versuchstierstämme durchzuführen; mit der Verabreichung der Prüfsubstanz sollte in einem geeigneten Zeitraum nach der Entwöhnung vom Muttertier begonnen werden.

Bei Versuchsbeginn sollte die Variabilität des Körpergewichtes der Tiere nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsbestimmung einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollte in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

**Anzahl und Geschlecht**

Bei Nagern sind mindestens 100 Tiere (50 weibliche und 50 männliche) für jede Dosisgruppe und für jede entsprechende Kontrollgruppe zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen.

Die behandelte(n) Satellitengruppe(n), die der Bewertung pathologischer Anzeichen mit Ausnahme von Tumoren dient (dienen), sollte(n) 20 Tiere je Geschlecht enthalten, während in der Satellitenkontrollgruppe lediglich zehn Tiere pro Geschlecht erforderlich sind.

### Dosierungen und Häufigkeit der Exposition

Zur Kanzerogenitätsbestimmung sind mindestens drei Dosisgruppen und eine zusätzliche Kontrollgruppe zu verwenden. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß nur geringgradige Vergiftungserscheinungen auftreten, wie etwa eine verzögerte Körpergewichtsentwicklung (weniger als 10%), ohne jedoch die normale Lebensdauer der Tiere durch andere als durch tumorbedingte Folgeerscheinungen zu beeinträchtigen.

Die niedrigste Dosierung sollte den normalen Verlauf von Wachstum und Entwicklung sowie die Lebensdauer der Tiere nicht beeinträchtigen und keinerlei Anzeichen einer toxischen Wirkung hervorrufen. Sie sollte normalerweise nicht weniger als 10 Prozent der höchsten Dosierung betragen.

Die mittlere Dosierung liegt zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung.

Bei der Auswahl der Dosierungen sind Daten aus vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen.

Zur Bestimmung der chronischen Toxizität werden zusätzlich behandelte Versuchstiergruppen sowie eine entsprechende Kontroll-Satellitengruppe in die Studie einbezogen. In der behandelten Satellitengruppe sollte die applizierte Dosis so gewählt werden, daß eindeutige Vergiftungserscheinungen auftreten.

Die Exposition erfolgt normalerweise täglich. Wird die Substanz im Trinkwasser verabreicht oder mit dem Futter vermischt, müssen Wasser bzw. Futter den Tieren jederzeit zugänglich sein.

### Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe muß, abgesehen von der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz, in jeder Hinsicht der Versuchstiergruppen entsprechen.

Unter besonderen Bedingungen, wie z. B. bei Verwendung eines Aerosols bei Inhalationsstudien oder eines Emulgators mit unbekannter biologischer Wirkung bei oralen Toxizitätsstudien, empfiehlt sich der Einsatz einer zusätzlichen unbehandelten Kontrollgruppe, der das Vehikel nicht appliziert werden darf.

### Verabreichungsweg

Im wesentlichen finden die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungsweges hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der Art der Exposition beim Menschen ab.

#### Orale Applikation

Wird die Prüfsubstanz vom Magen-Darm-Trakt absorbiert und ist eine Exposition beim Menschen auf oralem Weg möglich, sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, der orale Verabreichungsweg gewählt werden. Den Tieren sollte die Prüfsubstanz im Futter, gelöst im Trinkwasser oder in Kapseln zugeführt werden.

Wünschenswert ist eine tägliche Verabreichung an sieben Wochentagen, da bei einem fünftägigen Rhythmus während der verabreichungsfreien Zeit eine Erholung oder ein Rückgang von Vergiftungserscheinungen möglich ist und so das Ergebnis und die Bewertung beeinflussen kann. Aus praktischen Überlegungen ist jedoch ein fünftägiger Verabreichungsrhythmus als annehmbar zu betrachten.

#### Dermale Applikation

Die kutane Exposition durch Auftragen auf die Haut kann gewählt werden, um eine der wichtigsten Expositionsarten beim Menschen zu simulieren; sie dient gleichzeitig als Modell für die Induzierung von Hautveränderungen.

#### Inhalative Applikation

Da Studien über die inhalative Applikation im Vergleich zu den sonstigen Verabreichungswegen weit größere technische Probleme aufwerfen, soll hier eine ausführlichere Anleitung gegeben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die intratracheale Instillation in besonderen Fällen durchaus eine gültige Alternative darstellt.

Bei langfristigen Expositionen legt man üblicherweise entweder eine angenommene Exposition beim Menschen zugrunde, wonach die Tiere bei einheitlicher Testkammerkonzentration fünf Tage lang täglich sechs Stunden exponiert werden (intermittierende Exposition). Oder man geht von einer möglichen Exposition in der Umwelt aus, bei der die Tiere an sieben Tagen jeweils 22 bis 24 Stunden der Prüfsubstanz ausgesetzt sind (kontinuierliche Exposition) und pro Tag jeweils zur gleichen Zeit eine Stunde zur Fütterung und zur Wartung der Kammer vorgesehen ist. In beiden Fällen werden die Tiere normalerweise einer festgesetzten Konzentration der Prüfsubstanz ausgesetzt. Der Hauptunterschied, der zwischen der intermittierenden und der kontinuierlichen Exposition zu berücksichtigen ist, liegt darin, daß sich im ersten Falle die Tiere während der 17 bis 18stündigen expositionsfreien Periode und während des noch längeren Zeitraums am Wochenende möglicherweise von den Auswirkungen der täglichen Exposition erholen.

Welche der beiden Expositionsformen gewählt wird, hängt von den Zielsetzungen der jeweiligen Studie sowie von den beim Menschen gegebenen Voraussetzungen ab, die mit dem Test simuliert werden sollen. Einige technische Schwierigkeiten müssen jedoch berücksichtigt werden. So dürfte z. B. der Vorteil der kontinuierlichen Exposition bei der Simulierung von Umgebungsbedingungen sowohl durch die Notwendigkeit aufgehoben werden, die Tiere mit Wasser und Futter zu versorgen, als auch durch den Bedarf an besser entwickelten (und zuverlässigeren) Aerosol- sowie Dampferzeugungs- und Überwachungstechniken.

#### Expositionskammern

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die eine dynamische Luftgeschwindigkeit mit einer Luftwechselrate von mindestens zwölfmal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz in der Atmosphäre zu gewährleisten. Die Testkammern für die Kontroll- wie für die Versuchstiere sollten in Konzeption und Ausführung identisch sein, um in jeder Hinsicht — mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz — vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen. Üblicherweise wird in der Testkammer ein geringer Unterdruck erzeugt, um ein Entweichen der Prüfsubstanz aus der Kammer zu vermeiden. Die Testkammern sollten gewährleisten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere grundsätzlich 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten.

Folgende Messungen oder Kontrollen sind durchzuführen:

- a) Luftströmung: die Luftdurchflußrate innerhalb der Testkammer sollte vorzugsweise kontinuierlich überwacht werden;
- b) während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  des Mittelwertes variieren;  
Während der gesamten Versuchsdauer ist die tägliche Konzentration so konstant wie möglich zu halten;
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit: Bei Nagern soll die Temperatur  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) betragen und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zwischen 30 und 70 % liegen, es sei denn, die Prüfsubstanz wird mit Hilfe von Wasser in der Testkammer suspendiert. Es empfiehlt sich, beide Größen kontinuierlich zu überwachen;
- d) Teilchengrößenmessungen: Sowohl für Flüssig- als auch für Feststoffaerosole ist eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilung in der Kammeratmosphäre vorzunehmen. Die Aerosolteilchen müssen für die Versuchstiere lungengängig sein. Stichproben sind in der Atemzone der Tiere zu entnehmen. Diese Stichproben müssen repräsentativ für die Teilchenverteilung sein, der die Tiere ausgesetzt sind und sollten außerdem alle suspendierten Aerosole, auch wenn sie zum Großteil nicht lungengängig sind, gravimetrisch erfassen. Beim Aufbau der Versuchsanlage muß die Teilchengrößenanalyse so oft wie nötig wiederholt werden, um die Stabilität der Aerosolkonzentration zu gewährleisten. Während der folgenden Expositionen ist eine Wiederholung nur so oft erforderlich, wie es für eine angemessene Bestimmung der Konsistenz der Teilchenverteilung, der die Tiere ausgesetzt wurden, notwendig ist.

#### Versuchsdauer

Die Dauer der Kanzerogenitätsstudie umfaßt den größten Teil der Lebensdauer der Versuchstiere. Bei Mäusen und Hamstern sollte die Studie nach 18 Monaten, bei Ratten nach 24 Monaten abgeschlossen werden; bei bestimmten Tierstämmen mit längerer Lebensdauer und/oder geringer spontaner Tumorraten sollte die Studie jedoch erst nach 24 Monaten (Mäuse und Hamster) bzw. 30 Monaten (Ratten) beendet werden. Andererseits ist es vertretbar, eine derart verlängerte Studie dann abzuschließen, wenn die Überlebensrate in der niedrigsten Dosisgruppe oder der Kontrollgruppe 25 % erreicht. Ist ein offensichtlich geschlechtsspezifischer Unterschied in der Reaktion erkennbar, sollten die Versuchstiere im Hinblick auf den Abschluß der Studie in nach Geschlechtern getrennte Gruppen aufgeteilt werden. Ist lediglich in der hohen Dosisgruppe vorzeitig eine offensichtlich auf die toxische Wirkung zurückzuführende, hohe Sterberate festzustellen, muß dies nicht zwangsläufig den Abschluß der Studie zur Folge haben, vorausgesetzt, die toxische Wirkung wirft in den anderen Dosisgruppen keine schwerwiegenden Probleme auf. Von einem negativen Testergebnis kann nur dann gesprochen werden, wenn sich der Bestand der Tiere in jeder Gruppe durch Autolyse, Kannibalismus oder durch labortechnische Probleme um nicht mehr als 10 % verringert und die Überlebensrate in allen Gruppen bei einer 18monatigen (Mäuse und Hamster) bzw. 24monatigen Studiendauer (Ratten) nicht unter 50 % liegt.

Die zur Prüfung auf chronische Toxizität eingesetzten 20 exponierten Tiere pro Geschlecht und die dazugehörigen 10 Kontrolltiere pro Geschlecht sollten für mindestens 12 Monate in der Studie belassen werden. Durch Autopsie dieser Tiere soll festgestellt werden, ob sich, unabhängig vom Alterungsprozeß, prüfsubstanzbezogene pathologische Erscheinungsformen entwickelt haben.

#### Verfahren

##### Beobachtungen

Bei der täglichen Beobachtung der Tiere sollte insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des Zentralnervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster geachtet werden.

Die Tiere in der(den) behandelten Satellitengruppe(n) sollten in angemessenen Zeitabständen klinisch untersucht werden.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist notwendig, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und sezziert werden.

Klinische Symptome, einschließlich neurologischer und Augenveränderungen sowie Mortalität sind für jedes Tier aufzuzeichnen. Die Entwicklung von Tumoren ist mit besonderer Aufmerksamkeit zu verfolgen; dabei sind der Zeitpunkt der Entstehung und Entwicklung toxischer Symptome ebenso aufzuzeichnen wie der Zeitpunkt der Entstehung, die Lokalisierung, das Ausmaß, das Erscheinungsbild und die Progression jedes deutlich sichtbaren oder fühlbaren Tumors festzuhalten.

Die Nahrungsaufnahme (und der Wasserverbrauch, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird); sind während der ersten dreizehn Wochen der Studie wöchentlich und anschließend in dreimonatigen Abständen zu bestimmen, sofern nicht der Gesundheitszustand oder das Körpergewicht der Tiere andere Maßnahmen erfordern.

Das Körpergewicht jedes Einzeltieres ist während der ersten dreizehn Wochen des Tests einmal wöchentlich und anschließend mindestens einmal alle vier Wochen aufzuzeichnen.

#### *Klinische Untersuchungen*

##### Hämatologische Untersuchung

Eine hämatologische Untersuchung (z. B. Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Gesamtzahl der roten Blutkörperchen, Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen, Blutplättchen oder sonstige Messungen der Gerinnungsfähigkeit) der Blutproben von zehn Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen sollte nach drei Monaten, nach sechs Monaten und anschließend in etwa sechsmonatigen Abständen sowie nach Abschluß der Studie durchgeführt werden. Sofern durchführbar, sollten diese Blutproben bei jeder Untersuchung von der gleichen Ratte stammen.

Läßt die Beobachtung der Tiere im Verlauf der Studie auf eine Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes schließen, ist ein Differentialblutbild der erkrankten Tiere zu erstellen.

Das Differentialblutbild wird aus Blutproben von Tieren der höchsten Dosisgruppe und von Tieren aus den Kontrollgruppen erstellt. Für die Tiere der niedrigeren Dosisgruppe(n) ist die Erstellung eines Differentialblutbildes nur erforderlich, wenn zwischen der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe erhebliche Abweichungen bestehen oder wenn die pathologische Untersuchung dies angezeigt erscheinen läßt.

##### Urinanalyse

Urinproben sind von zehn Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen möglichst in den gleichen zeitlichen Abständen wie bei der vorstehend beschriebenen hämatologischen Untersuchung zu entnehmen. Bei Nagern sollten die folgenden Analysen entweder bei jedem Einzeltier oder auf der Grundlage einer Sammelprobe/Geschlecht/Gruppe durchgeführt werden:

- Aussehen: Volumen und spezifisches Gewicht für jedes Einzeltier;
- Protein, Glukose, Ketone, Blut (semiquantitativ);
- Urinsediment (semiquantitativ).

##### Klinische Chemie

In etwa halbjährlichen Abständen und bei Abschluß der Untersuchung werden von allen Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen — wenn möglich jeweils von der gleichen Ratte — Blutproben zu klinisch-chemischen Messungen entnommen. Zusätzlich sollte vor Beginn des Versuchs von allen Nichtnagern eine Probe entnommen werden.

Mit dem aus diesen Proben gewonnenen Plasma werden folgende Analysen durchgeführt:

- Gesamte Proteinkonzentration;
- Albuminkonzentration;
- Leberfunktionstests (wie alkalische Phosphatase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup> und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>, Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, Ornithin-Decarboxylase);
- Kohlehydratstoffwechsel, z. B. Nüchternglukose;
- Nierenfunktionstest, z. B. Harnstickstoff im Blut.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

## Autopsie

An allen Tieren, einschließlich der während des Versuchs gestorbenen bzw. aus Krankheitsgründen getöteten Tiere, wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Zuvor sollten von allen Tieren Blutproben zur Erstellung eines Differentialblutbildes entnommen werden. Alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Tumoren oder tumorverdächtigen Veränderungen müssen fixiert werden. Man sollte versuchen, die Beobachtungen der Autopsiebefunde mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung zu korrelieren.

Alle Organe und Gewebe sind für die mikroskopische Untersuchung zu fixieren. Hierzu zählen gewöhnlich folgende Organe und Gewebe: Gehirn <sup>(1)</sup> (Medulla/Pons, Kleinhirn- und Großhirnrinde), Hypophyse, Schilddrüse (einschließlich Nebenschilddrüse), Thymus, Lungen (einschließlich Trachea), Herz, Aorta, Speicheldrüsen, Leber <sup>(1)</sup>, Milz, Nieren <sup>(1)</sup>, Nebennieren <sup>(1)</sup>, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon, Rektum, Uterus, Harnblase, Lymphknoten, Pankreas, Gonaden <sup>(1)</sup>, akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüse, Haut, Muskulatur, Nerven des peripheren Systems, Wirbelsäule (Hals-, Thorax-, Lendenbereich), Brustbein mit Knochenmark und Femur (einschließlich Gelenk) und Augen. Die Instillierung der Lungen und der Harnblase mit Fixierlösung stellt die optimale Konservierung dieser Gewebe dar; bei Inhalationsstudien ist eine derartige Aufblähung der Lungen Voraussetzung zur Durchführung einer geeigneten histopathologischen Untersuchung. Bei Spezialuntersuchungen wie Inhalationsstudien muß der gesamte Respirationstrakt, einschließlich Nase, Pharynx und Larynx untersucht werden.

Werden sonstige klinische Untersuchungen durchgeführt, sollten die daraus gewonnenen Ergebnisse vor der mikroskopischen Untersuchung vorliegen, da sie dem Pathologen wichtige Hinweise geben können.

## Histopathologie

Für den Studienabschnitt chronische Toxizität

Sämtliche asservierten Organe aller Tiere aus den Satellitengruppen mit hoher Dosierung und aus den Kontrollgruppen sind eingehend zu untersuchen. Werden in der Satellitengruppe mit hoher Dosierung prüfsubstanzbedingte pathologische Befunde festgestellt, müssen auch die Zielorgane aller übrigen Tiere in jeder anderen behandelten Satellitengruppe einer umfassenden und ausführlichen histologischen Untersuchung unterzogen werden. Die gleiche Untersuchung ist bei allen Tieren der behandelten Gruppen aus dem der Kanzerogenitätsbestimmung gewidmeten Teil der Studie vorzunehmen.

Für den Studienabschnitt Kanzerogenität

- a) Die Organe aller Tiere, die während des Tests sterben bzw. getötet werden sowie aller Tiere der Kontrollgruppen und der Gruppen mit hoher Dosierung, werden einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen;
- b) alle Tumoren oder tumorverdächtigen Veränderungen an allen Organen sind in allen Dosisgruppen zu untersuchen;
- c) besteht zwischen der Gruppe mit der höchsten Dosierung und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit neoplastischer Veränderungen, so sollte das betreffende Organ bzw. Gewebe auch in den anderen Dosisgruppen einer histopathologischen Untersuchung unterzogen werden;
- d) ist die Überlebensrate in der Gruppe mit der höchsten Dosierung deutlich geringer als in der Kontrollgruppe, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen;
- e) lassen sich in der Gruppe mit der höchsten Dosierung toxische oder sonstige Wirkungen nachweisen, die ggf. Einfluß auf die Tumorentwicklung haben, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit während des Tests festgestellten Tumoren oder Vergiftungserscheinungen, der Zeitpunkt der Feststellung und die Anzahl der Tiere, bei denen nach der Autopsie ein Tumor nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu eignet sich jede anerkannte statistische Methode.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

— Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung.

<sup>(1)</sup> Diese Organe sind von zehn Nagetieren pro Geschlecht/Gruppe zu wiegen.

— Versuchsbedingungen:

Beschreibung des Expositionsapparates

einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in einer Versuchskammer, sofern eine benutzt wird. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gegebenenfalls Stabilität der Aerosolkonzentration oder der Teilchengröße sind zu beschreiben.

Expositionsdaten

Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
- b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
- c) nominale Konzentrationen (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
- d) gegebenenfalls Art des Vehikels;
- e) tatsächliche Konzentration im Atembereich;
- f) mittlere Teilchengröße (sofern erforderlich);

— Dosierungen (gegebenenfalls Vehikel, sofern benutzt) und Konzentrationen;

— Daten über die Häufigkeit von Tumoren, gegliedert nach Geschlecht, Dosierung und Art des Tumors;

— Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Versuchstiere, einschließlich der Tiere der Satellitengruppe, bis zum Abschluß des Versuchs überlebten;

— Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;

— Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;

— Zeitpunkt der Beachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;

— ophthalmologische Befunde;

— Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;

— hämatologische Tests und deren Ergebnisse;

— klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich einer evtl. Urinanalyse);

— Sektionsbefunde;

— detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— statistische Auswertung der Ergebnisse mit Beschreibung des angewandten Verfahrens;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT WÄHREND EINER GENERATION****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen männlicher und weiblicher Versuchstiere in abgestuften Dosierungen verabreicht. Den männlichen Tieren wird die Prüfsubstanz während der Wachstumsperiode und mindestens eines vollständigen Spermatogenesezyklus (etwa 56 Tage bei der Maus und 70 Tage bei der Ratte) verabreicht, um auf diese Weise negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf die Sperminogenese feststellen zu können.

Den weiblichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während mindestens zweier vollständiger Oestruszyklen verabreicht, um negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf den Oestrus beurteilen zu können. Anschließend werden die Tiere verpaart. Während der Paarungszeit wird die Prüfsubstanz beiden Geschlechtern verabreicht, anschließend nur den weiblichen Tieren während der Gravidität und der Laktation. Bei inhalativer Exposition sind Änderungen der Methode erforderlich.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode***Vorbereitungen*

Vor Testbeginn werden gesunde, junge, ausgewachsene Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Tiere werden dann für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen vor dem Test unter versuchsnahen Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen gehalten. Es wird empfohlen, die Prüfsubstanz mit dem Futter oder im Trinkwasser zu verabreichen. Andere Verabreichungswege sind ebenfalls zulässig. Während des eigentlichen Versuchsteils muß allen Tieren die Prüfsubstanz auf dem gleichen Wege appliziert werden. Wird eine Vehikel oder ein sonstiger Zusatz zur Erleichterung der Verabreichung benutzt, muß deren nichttoxische Wirkung gesichert sein. Die Verabreichung erfolgt an sieben Tagen pro Woche.

*Versuchstiere**Auswahl der Tierarten*

Bevorzugte Tierarten sind Ratte oder Maus. Tierstämme mit geringer Fruchtbarkeit sind auszuschließen und nur gesunde Tiere, die bisher noch keinen Versuchen unterzogen worden waren, einzusetzen. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter auszuwählen.

Um die Fruchtbarkeit ausreichend beurteilen zu können, müssen sowohl männliche als auch weibliche Tiere untersucht werden. Alle Versuchs- und Kontrolltiere müssen vor Verabreichung der Prüfsubstanz vom Muttertier entwöhnt sein.

*Anzahl und Geschlecht*

Jede Versuchstier- und Kontrollgruppe muß so viele Tiere enthalten, daß darin etwa 20 trächtige Weibchen kurz vor bzw. zum Zeitpunkt der Geburt enthalten sind.

Auf diese Weise soll gewährleistet werden, daß genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotentials der Prüfsubstanz für die Fertilität, Schwangerschaft, Verhalten des Muttertieres in der P-Generation sowie Säugen, Wachstum und Entwicklung der F<sub>1</sub>-Generation von der Konzeption bis zum Absetzen vom Muttertier vornehmen zu können.

### Versuchsbedingungen

Futter und Wasser ist den Tieren *ad libitum* bereitzustellen. Kurz vor dem Geburtstermin werden die trächtigen Weibchen einzeln in Geburtskäfigen untergebracht, die gegebenenfalls mit Nestmaterial ausgestattet sind.

### Dosierungen

Es sollten mindestens drei Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingesetzt werden. Wird ein Vehikel benutzt, muß die Kontrollgruppe das in der höchsten Dosierung applizierte Volumen erhalten. Wird die Nahrungsaufnahme oder -verwertung durch die Prüfsubstanz beeinträchtigt, könnte der Einsatz einer entsprechend restriktiv gefütterten Kontrollgruppe sinnvoll sein. Sofern die physikalisch-chemischen Eigenschaften bzw. die biologische Wirkungsweise der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosierung möglichst so gewählt werden, daß bei den Elterntieren (P) zwar Vergiftungserscheinungen auftreten, aber keine Mortalität verursacht wird. Im günstigsten Falle sollte(n) die mittlere(n) Dosierung(en) minimale prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen bewirken, die niedrigste Dosierung hingegen weder bei den Elterntieren noch bei den Nachkommen feststellbare negative Auswirkungen zeigen. Wird die Prüfsubstanz per Morgensonde oder in Form von Kapseln verabreicht, muß die jeweilige Dosis entsprechend dem Körpergewicht unter Berücksichtigung der Veränderungen des Körpergewichts wöchentlich angepaßt werden. Während der Gravidität kann die Dosierung bei den weiblichen Tieren entweder aufgrund des Körpergewichts am Tag 0 oder am Tag 6 der Gravidität bestimmt werden.

### Limit-Test

Wenn im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität eine Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht nachweisbar keinen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit hat, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig. Konnten in einer Vorstudie mit hoher Dosierung, die eindeutige, prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen beim Muttertier hervorrief, keinerlei nachteilige Auswirkungen auf die Fertilität festgestellt werden, können auch hier Untersuchungen mit anderen Dosierungen als nicht notwendig erachtet werden.

### Versuchsdurchführung

#### Vorgehensweise

Die tägliche Verabreichung der Prüfsubstanz an die männlichen Elterntiere (P) sollte nach der Entwöhnung vom Muttertier und einer mindestens 5tägigen Akklimatisierung im Alter von 5 bis 9 Wochen beginnen. Bei den Ratten wird die Applikation für weitere 10 Wochen (bei Mäusen 8 Wochen) bis zur Paarungszeit fortgesetzt. Die männlichen Tiere werden nach der Verpaarung entweder getötet und untersucht oder weiterhin bei der Versuchsdiät belassen, um gegebenenfalls zur Erzeugung eines zweiten Wurfes zur Verfügung zu stehen, sollten jedoch noch vor Abschluß der Studie getötet und untersucht werden. Die weiblichen Elterntiere (P) erhalten die Prüfsubstanz nach einer mindestens 5tägigen Akklimatisierung bis mindestens 2 Wochen vor der Paarung. Die Behandlung der P-Weibchen wird während der 3wöchigen Paarungszeit, der gesamten Gravidität bis zur Entwöhnung der F<sub>1</sub>-Nachkommen fortgesetzt. Eine Änderung des Verabreichungsschemas kann aufgrund sonstiger verfügbarer Informationen über die Prüfsubstanz, z. B. über Stoffwechselmechanismen oder Bioakkumulation, erforderlich sein.

#### Verpaarung

Bei Reproduktionsstudien über die toxikologischen Auswirkungen kann die Verpaarung entweder im Verhältnis 1:1 (ein männliches und ein weibliches Tier) oder 1:2 (ein männliches und zwei weibliche Tiere) erfolgen.

Bei der 1:1-Verpaarung wird das weibliche mit einem männlichen Tier bis zum Eintritt der Gravidität oder bis nach Ablauf von 3 Wochen zusammengebracht. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfröpfe untersucht. Als Tag 0 der Gravidität gilt der Tag, an dem Vaginalpfröpfe oder Sperma festgestellt werden konnte.

Bei erfolgloser Verpaarung sollten die entsprechenden Tiere zur Beurteilung der Ursache für die Unfruchtbarkeit untersucht werden. Dies bedeutet gegebenenfalls eine weitere Verpaarung mit einem Tier mit nachgewiesener Fruchtbarkeit, die mikroskopische Untersuchung der Reproduktionsorgane und die Untersuchung der Oestruszyklen oder der Spermio-genese.

#### Wurfgrößen

Die während der Fruchtbarkeitsstudie behandelten Tiere können ihre Jungen auf natürlichem Wege zur Welt bringen und ohne jeden äußeren Eingriff bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung großziehen.

Soll die Anzahl der geworfenen Jungtiere reduziert werden, wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Zwischen Tag 1 und Tag 4 nach der Geburt werden aus jedem Wurf so viele Jungtiere ausgesondert, bis möglichst 4 männliche und 4 weibliche Tiere verbleiben. Ist es aufgrund der Geschlechter-Verteilung nicht möglich, in jedem Wurf 4 männliche und 4 weibliche Junge zu belassen, so ist eine partielle Anpassung zulässig (z. B. 5 männliche und 3 weibliche Tiere). Für Würfe mit weniger als 8 Jungtieren gilt diese Anpassung nicht.

### Beobachtungen

Während der gesamten Testperiode werden die Tiere mindestens einmal täglich beobachtet. Auffallende Verhaltensstörungen, Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt, alle Vergiftungserscheinungen, einschließlich Mortalität, sind aufzuzeichnen. Vor und während der Paarungszeit ist die Futtermittelaufnahme wöchentlich zu bestimmen. Wahlweise kann die tägliche Bestimmung der Nahrungsaufnahme auch während der Gravidität durchgeführt werden. Nach der Geburt und während der Stillperiode soll die Bestimmung der Nahrungsaufnahme (und der Wasseraufnahme, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird, am gleichen Tag wie das Wiegen der Jungtiere erfolgen. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen werden. Die Beobachtungen sind für jedes erwachsene Tier einzeln aufzuzeichnen.

Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet. Jeder Wurf ist sobald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Lebend- und Totgeburten und auffallende Anomalien feststellen zu können.

Tote und am Tag 4 getötete Jungtiere müssen asserviert und auf mögliche Fehlbildungen untersucht werden. Die lebendgeborenen Jungtiere werden gezählt und der gesamte Wurf und die einzelnen Tiere am Morgen nach der Geburt, an den Tagen 4 und 7 und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen. Bei den Muttertieren oder den Nachkommen zu beobachtende körperliche Anomalien oder Verhaltensstörungen müssen aufgezeichnet werden.

### Pathologie

#### Autopsie

Die Tiere der P-Generation sollten zum Zeitpunkt der Tötung bzw. bei Eintritt des Todes während der Studie makroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen, unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsorgane, untersucht werden. Auch tote oder kranke Jungtiere sind auf Fehlbildungen zu untersuchen.

### Histopathologie

Eierstöcke, Uterus, Zervix, Vagina, Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, Prostata, Koagulationsdrüse, Hirnanhangdrüse und Zielorgan(e) aller Tiere der P-Generation werden für die mikroskopische Untersuchung asserviert. Sollten diese Organe bisher nicht im Rahmen einer sonstigen Studie mit Mehrfachdosierung untersucht worden sein, ist in allen Versuchstiergruppen mit hoher Dosierung, bei den Kontrolltieren und den während der Studie gestorbenen Tieren — sofern durchführbar — eine mikroskopische Untersuchung vorzunehmen.

Alle Organe, die bei dieser Untersuchung pathologische Veränderungen aufweisen, müssen anschließend ebenfalls bei allen übrigen Tieren der P-Generation untersucht werden. In diesem Fall sollte eine mikroskopische Untersuchung aller Gewebe mit auffallenden pathologischen Veränderungen erfolgen.

Wie bereits im Abschnitt über die Verpaarung vorgeschlagen, sollten die Fortpflanzungsorgane aller Tiere bei Verdacht auf Unfruchtbarkeit mikroskopischen Untersuchungen unterzogen werden.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Anzahl der fruchtbaren männlichen Tiere, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die jeweilige Art der Veränderungen und der Prozentsatz der Tiere mit der jeweiligen Veränderung.

Sofern möglich, sollten die numerischen Ergebnisse anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens bewertet werden. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Tierarten/Tierstamm;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und Lebensfähigkeit;

- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zur geplanten Tötung bzw. zum Abschluß der Studie überlebten;
- Tabelle mit Gewichtsangaben für jeden Wurf, das durchschnittliche Gewicht der Jungtiere sowie das individuelle Gewicht der Jungtiere bei Abschluß der Studie;
- toxische oder andere Auswirkungen auf die Reproduktion, die Nachkommenschaft, das postnatale Wachstum, usw.;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Körpergewicht der Tiere der P-Generation;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung der mikroskopischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

### 4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT WÄHREND ZWEIER GENERATIONEN

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen männlicher und weiblicher Versuchstiere in abgestuften Dosierungen verabreicht. Den männlichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während der Wachstumsperiode und mindestens eines vollständigen Spermatogenesezyklus (etwa 56 Tage bei der Maus und 70 Tage bei der Ratte) verabreicht, um auf diese Weise negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf die Spermiogenese feststellen zu können.

Den weiblichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während mindestens zweier vollständiger Oestruszyklen verabreicht, um negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf den Oestrus beurteilen zu können. Die Verabreichung der Prüfsubstanz erfolgt auch während der Entwöhnungsphase der F<sub>1</sub>-Nachkommenschaft, während deren gesamter Wachstumsperiode, der Paarungszeit und der Erzeugung der F<sub>2</sub>-Generation bis zur Entwöhnung der F<sub>2</sub>-Nachkommen. Bei inhalativer Exposition sind Änderungen des Verfahrens erforderlich.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitungen*

Vor Testbeginn werden gesunde, junge, ausgewachsene Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Tiere der P-Generation werden dann für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen vor dem Test unter versuchsnahen Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen gehalten. Es wird empfohlen, die Prüfsubstanz mit dem Futter oder im Trinkwasser zu verabreichen. Andere Verabreichungswege sind ebenfalls zulässig. Während des eigentlichen Versuchsteils muß allen Tieren die Prüfsubstanz auf dem gleichen Wege appliziert werden. Wird ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz zur Erleichterung der Verabreichung benutzt, muß deren nichttoxische Wirkung gesichert sein. Die Verabreichung erfolgt an sieben Tagen pro Woche.

*Versuchstiere: Auswahl der Tierarten*

Bevorzugte Tierarten sind Ratte oder Maus. Es sind gesunde Tiere der P-Generation, die bisher noch keinem Versuch unterzogen wurden, einzusetzen. Die Versuchstiere sind in bezug auf Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter auszuwählen.

Um die Fruchtbarkeit ausreichend beurteilen zu können, müssen sowohl männliche als auch weibliche Tiere untersucht werden. Alle Versuchs- und Kontrolltiere müssen vor Verabreichung der Prüfsubstanz vom Muttertier entwöhnt sein.

*Anzahl und Geschlecht*

Jede Versuchstier- und Kontrollgruppe muß so viele Tiere enthalten, daß darin etwa 20 trächtige Weibchen kurz vor bzw. zum Zeitpunkt der Geburt enthalten sind. Auf diese Weise soll gewährleistet werden, daß genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotentials

der Prüfsubstanz für die Fertilität, Schwangerschaft, Verhalten des Muttertieres, Säugen, Wachstum und Entwicklung der F<sub>1</sub>-Generation von der Konzeption bis zur Geschlechtsreife, einschließlich der Entwicklung der F<sub>2</sub>-Generation bis zum Absetzen vom Muttertier zu ermöglichen.

#### *Versuchsbedingungen*

Futter und Wasser ist den Tieren *ad libitum* bereitzustellen. Kurz vor dem Geburtstermin werden die trächtigen Weibchen einzeln in Geburtskäfigen untergebracht, die gegebenenfalls mit Nestmaterial ausgestattet sind.

#### Dosierungen

Es sollten mindestens drei Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingesetzt werden. Wird ein Vehikel benutzt, muß die Kontrollgruppe das in der höchsten Dosierung applizierte Volumen erhalten. Wird die Nahrungsaufnahme oder -verwertung durch die Prüfsubstanz beeinträchtigt, könnte der Einsatz einer entsprechend restriktiv gefütterten Kontrollgruppe sinnvoll sein. Sofern die physikalisch-chemischen Eigenschaften bzw. die biologische Wirkungsweise der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosierung möglichst so gewählt werden, daß bei den Elterntieren zwar Vergiftungserscheinungen auftreten, aber keine Mortalität verursacht wird. Im günstigsten Falle sollte(n) die mittlere(n) Dosierung(en) minimale prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen bewirken, die niedrigste Dosierung hingegen weder bei den Erzeugertieren noch bei der Nachkommenschaft feststellbare negative Auswirkungen zeigen. Wird die Prüfsubstanz per Magensonde oder in Form von Kapseln verabreicht, muß die jeweilige Dosis entsprechend dem Körpergewicht unter Berücksichtigung der Veränderungen des Körpergewichts wöchentlich angepaßt werden. Bei den weiblichen Tieren kann während der Gravidität die Dosierung entweder aufgrund des Körpergewichts am Tag 0 oder am Tag 6 der Gravidität bestimmt werden.

#### Limit-Test

Wenn im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität eine Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht nachweisbar keinen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit hat, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig. Konnten in der Vorstudie mit hoher Dosierung, die eindeutige, prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen beim Muttertier hervorrief, keinerlei nachteilige Auswirkungen auf die Fertilität festgestellt werden, können auch hier Untersuchungen mit anderen Dosierungen als nicht notwendig erachtet werden.

#### *Versuchsdurchführung*

##### Vorgehensweise

Die tägliche Verabreichung der Prüfsubstanz an die männliche Parentalgeneration (P) sollte nach der Entwöhnung vom Muttertier und einer mindestens 5-tägigen Akklimatisierung im Alter von 5 bis 9 Wochen beginnen. Bei den Ratten wird die Applikation für weitere 10 Wochen (bei Mäusen 8 Wochen) bis zur Verpaarung fortgesetzt. Die männlichen Tiere werden nach der Verpaarung entweder getötet und untersucht oder weiterhin bei der Versuchsdiet belassen, um gegebenenfalls zur Erzeugung eines zweiten Wurfs zur Verfügung zu stehen, sollten jedoch noch vor Abschluß des gesamten Versuchs getötet und untersucht werden.

Die weiblichen Elterntiere erhalten die Prüfsubstanz nach einer mindestens 5-tägigen Akklimatisierung bis mindestens 2 Wochen vor der Paarung. Die tägliche Behandlung der P-Weibchen erfolgt während der 3-wöchigen Paarungszeit, der gesamten Gravidität und wird bis zur Entwöhnung der F<sub>1</sub>-Nachkommen fortgesetzt. Eine Änderung des Verabreichungsschemas kann aufgrund sonstiger verfügbarer Informationen über die Prüfsubstanz, z. B. über Stoffwechselmechanismen oder Bioakkumulation, erforderlich sein.

Die Behandlung der F<sub>1</sub>-Tiere beginnt mit der Entwöhnung und endet mit ihrer Tötung.

##### Verpaarung

Bei Reproduktionsstudien über die toxikologischen Auswirkungen kann die Verpaarung entweder im Verhältnis 1:1 (ein männliches und ein weibliches Tier) oder 1:2 (ein männliches und zwei weibliche Tiere) erfolgen.

Bei der 1:1-Verpaarung wird das weibliche mit einem männlichen Tier bis zum Eintritt der Gravidität oder bis nach Ablauf von 3 Wochen zusammengebracht. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfropfe untersucht. Als Tag 0 der Gravidität gilt der Tag, an dem Vaginalpfropfe oder Sperma festgestellt werden konnte.

Unter Berücksichtigung der Spermio-genese sollten die F<sub>1</sub>-Nachkommen frühestens im Alter von 11 Wochen (Maus) bzw. 13 Wochen (Ratte) verpaart werden. Für die Verpaarungen der F<sub>1</sub>-Generation werden aus jedem Wurf willkürlich ein männliches und ein weibliches Tier ausgewählt und zur kreuzweisen Verpaarung mit einem Jungtier eines anderen Wurfs aus der gleichen Dosisgruppe zusammengebracht. Die nicht für eine Verpaarung vorgesehenen männlichen und weiblichen F<sub>1</sub>-Tiere werden nach der Entwöhnung vom Muttertier getötet.

Bei erfolgloser Verpaarung sollten die entsprechenden Tiere zur Beurteilung der Ursache für die Unfruchtbarkeit untersucht werden. Dies bedeutet gegebenenfalls eine weitere Verpaarung mit einem Tier mit nachgewiesener Fruchtbarkeit, eine mikroskopische Untersuchung der Fortpflanzungsorgane und eine Untersuchung der Oestruszyklen oder der Spermio-genese.

#### Wurfgröße

Die während der Fruchtbarkeitsstudie behandelten Tiere können ihre Jungen auf natürlichem Wege zur Welt bringen und ohne jeden äußeren Eingriff bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung großziehen.

Soll die Anzahl der geworfenen Jungtiere reduziert werden, wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Zwischen Tag 1 und Tag 4 nach der Geburt werden aus jedem Wurf so viele Jungtiere ausgesondert, bis möglichst 4 männliche und 4 weibliche Tiere verbleiben. Ist es aufgrund der Geschlechter-Verteilung nicht möglich, in jedem Wurf 4 männliche und 4 weibliche Junge zu belassen, so ist eine partielle Anpassung zulässig (z. B. 5 männliche und 3 weibliche Tiere). Für Würfe mit weniger als 8 Jungtieren gilt diese Anpassung nicht. Bei den Jungtieren der F<sub>2</sub>-Generation ist in gleicher Weise vorzugehen.

#### Beobachtungen

Während der gesamten Testperiode werden die Tiere mindestens einmal täglich beobachtet. Auffallende Verhaltensstörungen, Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt, alle Vergiftungserscheinungen, einschließlich Mortalität, sind aufzuzeichnen. Vor und während der Paarungszeit ist die Futteraufnahme wöchentlich zu ermitteln. Wahlweise kann die tägliche Bestimmung der Nahrungsaufnahme auch während der Gravidität durchgeführt werden. Nach der Geburt und während der Stillperiode soll die Bestimmung der Nahrungsaufnahme am gleichen Tag wie das Wiegen der Jungtiere erfolgen. Die Elterntiere (P- und F<sub>1</sub>-Generation) müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen werden. Die Beobachtungen sind für jedes erwachsene Tier einzeln aufzuzeichnen.

Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet. Jeder Wurf ist sobald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um Anzahl und Geschlecht der Nachkommen, Lebend- und Totgeburten und auffallende Anomalien feststellen zu können.

Tote und am Tag 4 getötete Jungtiere müssen asserviert und auf mögliche Fehlbildungen hin untersucht werden. Die lebendgeborenen Jungtiere werden gezählt und der gesamte Wurf und die einzelnen Tiere am Morgen nach der Geburt, an den Tagen 4 und 7 und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen, und zwar bis zum Abschluß der Untersuchung, wenn die Tiere einzeln gewogen werden. Bei den Muttertieren oder den Nachkommen zu beobachtende körperliche Anomalien oder Verhaltensstörungen müssen aufgezeichnet werden.

#### Pathologie

##### Autopsie

Alle erwachsenen Tiere der P- und der F<sub>1</sub>-Generation werden getötet, wenn die Beurteilung der Reproduktionsfähigkeit abgeschlossen ist. Die nicht für die Paarung ausgewählten F<sub>1</sub>-Nachkommen und alle F<sub>2</sub>-Nachkommen werden nach der Entwöhnung getötet.

Die Elterntiere (P- und F<sub>1</sub>-Generation) sollten zum Zeitpunkt der Tötung bzw. bei Eintritt des Todes während der Studie mikroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen, unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsorgane, untersucht werden. Auch tote oder kranke Jungtiere sind auf Fehlbildungen zu untersuchen.

#### Histopathologie

Eierstöcke, Uterus, Cervix, Vagina, Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, Koagulationsdrüse, Prostata, Hirnanhangdrüse und Zielorgan(e) aller für die Verpaarung ausgewählten Tiere der P- und F<sub>1</sub>-Generation werden, sofern erforderlich, für die mikroskopische Untersuchung asserviert. Sollten diese Organe bisher nicht im Rahmen einer sonstigen Studie mit Mehrfachdosierung untersucht worden sein, ist in allen Versuchstiergruppen mit hoher Dosierung, bei den Kontrolltieren der P-Generation und den für die Fortpflanzung ausgewählten Tieren der F<sub>1</sub>-Generation sowie an den während der Studie gestorbenen Tieren — sofern durchführbar — eine mikroskopische Untersuchung vorzunehmen. Alle Organe, die bei dieser Untersuchung pathologische Veränderungen aufweisen, müssen anschließend ebenfalls bei allen übrigen Tieren der anderen Dosisgruppen untersucht werden. In diesem Fall sollte eine mikroskopische Untersuchung aller Gewebe mit auffallenden pathologischen Veränderungen erfolgen. Wie bereits im Abschnitt über die Verpaarung vorgeschlagen, sollten die Fortpflanzungsorgane aller Tiere bei Verdacht auf Unfruchtbarkeit einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen werden.

**2. DATEN***Auswertung der Ergebnisse*

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Anzahl der fruchtbaren männlichen Tiere, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die jeweilige Art der Veränderungen und der Prozentsatz der Tiere mit der jeweiligen Veränderung.

Sofern möglich, sollten die numerischen Ergebnisse anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens bewertet werden. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Tierarten/Tierstamm;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und Lebensfähigkeit;
- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zum Abschluß des Versuchs überlebten;
- Tabelle mit Gewichtsangaben für jeden Wurf, das mittlere Gewicht der Jungtiere sowie das individuelle Gewicht der Jungtiere bei Abschluß der Studie;
- toxische oder andere Auswirkungen auf die Reproduktion, die Nachkommenschaft, das postnatale Wachstum, usw.;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Körpergewicht der für die Verpaarung ausgewählten P- und F<sub>1</sub>-Tiere;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung der mikroskopischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**TOXIKOKINETIK****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird auf einem geeigneten Weg verabreicht. Je nach Zweck der Untersuchung kann die Substanz einmalig oder in bestimmten Zeitabständen wiederholter Dosierung einer oder mehreren Gruppen von Versuchstieren verabreicht werden. Anschließend werden je nach Art der Untersuchung die Substanz und/oder ihre Metaboliten in den Körperflüssigkeiten, Gewebe und/oder Ausscheidungen bestimmt.

Die Untersuchungen können mit „unmarkierter“ oder „markierter“ Prüfsubstanz erfolgen. Wird eine radioaktive Markierung verwendet, sollte sie in der Substanz in der Form enthalten sein, daß sie möglichst viele Informationen über das Schicksal der Verbindung liefert.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode***Vorbereitung*

Gesunde, junge, ausgewachsene Tiere werden mindestens 5 Tage vor dem Versuch an die Laborbedingungen akklimatisiert. Vor Beginn des Versuches werden die Tiere randomisiert und in Behandlungsgruppen eingeteilt. Für bestimmte Fragestellungen können sehr junge, trüchtige oder vorbehandelte Tiere verwendet werden.

*Versuchsbedingungen***Versuchstiere**

Toxikokinetische Untersuchungen können an einer oder mehreren geeigneten Tierarten durchgeführt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, ob diese Tierarten in anderen toxikologischen Untersuchungen mit der gleichen Substanz verwendet wurden oder verwendet werden sollen. Dienen Nager als Versuchstiere, sollten die Gewichtsschwankungen  $\pm 20\%$  vom Durchschnittsgewicht nicht überschreiten.

**Anzahl und Geschlecht**

Für die Untersuchungen zu Absorption und Exkretion sollte jede Dosierungsgruppe zu Beginn 4 Tiere umfassen. Eine geschlechtsspezifische Auswahl ist nicht erforderlich, doch kann es unter bestimmten Umständen notwendig sein, beide Geschlechter zu untersuchen. Treten geschlechtsspezifische Unterschiede auf, sollten vier Tiere beider Geschlechter untersucht werden. Bei Untersuchungen an Nicht-Nagern reicht auch eine geringere Anzahl von Tieren aus.

Für die Untersuchung zur Verteilung sollten bei der Festlegung der anfänglichen Gruppengröße sowohl die Anzahl der zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zu tötenden Tiere als auch die Anzahl der Untersuchungszeitpunkte berücksichtigt werden.

Für die Untersuchung zum Metabolismus ist die Zahl der Tiere pro Gruppe entsprechend zu erhöhen.

Bei Untersuchungen mit mehreren Dosierungen und mehreren Untersuchungszeitpunkten sind bei der Festlegung der Zahl der Tiere die Anzahl der Untersuchungszeitpunkte und geplanten Tötungen zu berücksichtigen. Jede Gruppe pro Zeitpunkt der Untersuchung muß jedoch aus mindestens 2 Tieren bestehen. Die Zahl der Tiere sollte ausreichen, um hinlängliche Informationen über Aufnahme, Plateau und Abnahme (je nach Bedarf) der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten zu liefern.

#### Dosierungen

Bei einmaliger Verabreichung sind mindestens zwei Dosierungen zu wählen: eine niedrige Dosierung, bei der keine toxischen Wirkungen zu beobachten sind und eine hohe Dosierung, bei der Veränderung der toxikokinetischen Parameter auftreten können oder bei der eine toxische Wirkung eintritt.

Bei mehrmaliger Verabreichung reicht die niedrige Dosis normalerweise aus, doch kann unter bestimmten Umständen auch eine hohe Dosis erforderlich sein.

#### Verabreichungsweg

Bei den toxikokinetischen Untersuchungen ist der gleiche Verabreichungsweg und ggf. das gleiche Vehikel zu verwenden wie bei anderen schon durchgeführten oder geplanten Toxizitätsuntersuchungen. Die Prüfsubstanz wird im allgemeinen den Versuchstieren in festgelegten Zeiträumen oral mit einer Magensonde oder im Futter, durch Inhalation oder dermal verabreicht. Die intravenöse Verabreichung der Prüfsubstanz kann zur Bestimmung der relativen Absorptionsrate bei einer anderen Applikationsroute sinnvoll sein. Außerdem lassen sich bald nach der intravenösen Verabreichung einer Prüfsubstanz Informationen über das Verteilungsmuster ermitteln.

Die Möglichkeit einer Interferenz zwischen Vehikel und Prüfsubstanz ist zu berücksichtigen. Es ist darauf zu achten, ob die Absorptionsrate bei Verabreichung der Prüfsubstanz mit der Magensonde Unterschiede im Vergleich zur Verabreichung im Futter aufweist und daß die Dosis genau bestimmt wird, vor allem bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Futter. Die Dosierung — vor allem bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Futter — muß genau bestimmt werden können.

#### Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich zu beobachten; Zeichen von Toxizität sowie relevante klinische Beobachtungen und deren Beginn, Ausmaß und Dauer sind aufzuzeichnen.

#### Verfahren

Nach Feststellen des Körpergewichtes der Versuchstiere wird die Prüfsubstanz auf geeignetem Wege verabreicht. Falls erforderlich, sollten die Tiere die Prüfsubstanz nüchtern erhalten.

#### Absorption

Geschwindigkeit und Ausmaß der Absorption der verabreichten Substanz lassen sich mit verschiedenen Methoden mit und ohne Referenzgruppen<sup>(1)</sup> bestimmen, z. B. durch:

- Bestimmung der Menge der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten in den Exkreten, z. B. im Urin, Gallenflüssigkeit, Faeces, Atemluft sowie im Körper der getöteten Tiere;
- Vergleich der biologischen Wirkung (z. B. Untersuchungen zur akuten Toxizität) bei Versuchs- und Kontroll- und/oder Referenzgruppen;
- Vergleich der über die Nieren ausgeschiedenen Substanz und/oder ihrer Metaboliten bei Versuchs- und Referenzgruppen;
- Bestimmung der Fläche unter der Plasma-Spiegel-Kurve der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten und deren Vergleich mit Daten von Referenzgruppen.

<sup>(1)</sup> Bei der Referenzgruppe handelt es sich um eine Gruppe, der die Prüfsubstanz auf einem anderen Wege verabreicht wird und die die vollständige Verfügbarkeit der Dosis gewährleistet.

### Verteilung

Zur Analyse der Verteilungsmuster stehen derzeit zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die einzeln oder gemeinsam eingesetzt werden können:

- qualitative Informationen liefern Ganzkörper-Autoradiographieverfahren;
- quantitative Informationen erhält man durch Tötung der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Exposition und Bestimmung von Konzentration und Menge der Prüfsubstanz und/oder ihrer Stoffwechselprodukte in Geweben und Organen.

### Exkretion

Bei den Exkretionsuntersuchungen werden Urin, Faezes und Atemluft und — unter bestimmten Umständen — Gallenflüssigkeit gesammelt. Die Menge der Prüfsubstanz und/oder ihrer Stoffwechselprodukte in diesen Ausscheidungen ist zu verschiedenen Zeiten nach der Exposition zu messen, bis etwa 95 % der verabreichten Dosis ausgeschieden wurde (höchstens jedoch sieben Tage lang).

In besonderen Fällen kann es notwendig sein, auch die Exkretion der Prüfsubstanz in der Milch säugender Versuchstiere zu berücksichtigen.

### Stoffwechsel

Zur Bestimmung von Stoffwechselintensität und -muster sind biologische Proben durch geeignete Verfahren zu analysieren. Wenn sich aus vorangegangenen toxikologischen Untersuchungen Fragen ergeben, dann sind Strukturen von Metaboliten zu klären und entsprechende Stoffwechselwege aufzuzeigen. *In vitro*-Untersuchungen können sich zur Ermittlung von Informationen über Stoffwechselwege als nützlich erweisen.

Weitere Angaben über die Beziehung zwischen Stoffwechsel und Toxizität können biochemische Untersuchungen liefern, z. B. die Bestimmung der Beeinflussung metabolisierender Enzymsysteme, die Abnahme endogener Nicht-Eiweißartiger-Sulphydryl-Verbindungen und die Bindung der Substanz an Makromoleküle.

## 2. DATEN

Je nach Art der durchgeführten Untersuchung sind die Daten in tabellarischer Form, ggf. ergänzt durch graphische Darstellungen, zusammenzufassen. Soweit sinnvoll, sind für jede Versuchsgruppe die durchschnittlichen und statistischen Schwankungen in Relation zu Zeit, Dosierung, Gewebe und Organen anzugeben. Absorptionsrate und Ausscheidungsmenge und -Geschwindigkeit sind durch geeignete Verfahren zu bestimmen. Bei Stoffwechseluntersuchungen ist die Struktur der ermittelten Metaboliten anzugeben; mögliche Stoffwechselwege sind aufzuzeichnen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Merkmale der markierten Stoffe, sofern verwendet;
- Dosierungen und zeitliche Abstände zwischen den Verabreichungen;
- Verabreichungsweg(e) und evtl. verwendete Vehikel;
- toxische und andere beobachtete Wirkungen;
- Verfahren zur Bestimmung der Prüfsubstanz und/oder ihrer Stoffwechselprodukte in biologischen Proben einschließlich Atemluft;
- tabellarische Darstellung der Messungen nach Geschlecht, Dosierung, Futter, Zeit, Geweben und Organen;

- 
- Angaben über Absorptionsrate und Exkretion über die Zeit;
  - Verfahren zur Beschreibung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten in biologischen Proben;
  - Verfahren für biologische Stoffwechselfmessungen;
  - vorgeschlagene Stoffwechselwege;
  - Diskussion der Ergebnisse;
  - Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATURHINWEISE**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

**MUTAGENITÄT — (EINSCHLIESSLICH PRESCREENING BETREFFEND KREBSERZEUGENDE EIGENSCHAFTEN)****GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Verschiedene haploide und diploide Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* können zur Ermittlung chemisch induzierter Genmutationen verwendet werden. Die Versuche können sowohl mit oder ohne exogenes metabolisierendes System durchgeführt werden.

Vorwärtsmutationssysteme an haploiden Stämmen, wie die Messung der Mutation von roten, adeninabhängigen Mutanten (*ade-1*, *ade-2*) zu doppelt adeninabhängigen weißen Mutanten und Selektivsysteme, wie die Induktion einer Cycloheximid- und Kanavaninresistenz, werden verwendet.

Bei dem am besten validierten Rückmutationssystem wird der haploide Stamm XV 185-14C verwendet. Er weist die „ochre“-Nonsense-Mutationen *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* und *trp 5-48*, die durch Basenaustauschmutagene, die ortsspezifische Mutationen oder „ochre“-Suppressor-Mutationen induzieren, reversibel sind. XV 185-14C weist außerdem den Marker *his 1-7*, eine Missense-Mutation, die hauptsächlich durch Mutationen an einem zweiten Genort reversibel ist, sowie den Marker *hom 3-10* auf, der durch Rasterschubmutagene reversibel ist.

Der einzige gut validierte Stamm ist D<sub>7</sub>, der für *ilv 1-92* homozygot ist.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode****Vorbereitung**

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- oder Bezugssubstanzen sind unmittelbar vor der Prüfung in einem geeigneten Lösungsmittel zu lösen. Bei wasserunlöslichen organischen Verbindungen sind organische Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton und Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verwenden, wobei die Konzentration 2% v/v nicht überschreiten darf. Die Endkonzentration des Lösungsmittels soll die Überlebensrate und die Wachstumseigenschaften der Zellen nicht signifikant verändern.

**Stoffwechselaktivierung**

Die Behandlung der Zellen mit den Prüfsubstanzen sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen.

Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion aus Lebern von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien vorbehandelt wurden. Auch andere Arten, Gewebe, post-mitochondriale Fraktionen oder Verfahren können sich für die Stoffwechselaktivierung eignen.

### Versuchsbedingungen

#### Versuchsstämme

In Genmutationsuntersuchungen werden am häufigsten der haploide Stamm XV 185-14 C und der diploide Stamm D<sub>7</sub> verwendet. Auch andere Stämme können sich eignen.

#### Medien

Zur Bestimmung der Überlebensrate und Mutantenzahl sind geeignete Kulturmedien zu verwenden.

#### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Positivkontrollen, unbehandelte und Lösungsmittelkontrollen sind gleichzeitig anzulegen. Für jeden spezifischen Mutationsendpunkt sind geeignete Positivkontrollsubstanzen zu verwenden.

#### Konzentrationen

Es sind mindestens fünf deutlich unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Bei toxischen Substanzen sollte die höchste Konzentration die Überlebensrate nicht unter 5 bis 10% senken. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### Inkubationsbedingungen

Die Platten werden für 4—7 Tage bei 28 bis 30° C im Dunkeln inkubiert.

#### Häufigkeiten von Spontanmutationen

Es sind Subkulturen zu verwenden, in denen sich die Spontanmutationshäufigkeiten im üblichen Rahmen bewegen.

#### Anzahl der Platten

Mindestens 3 Platten pro Konzentration sind für den Nachweis prototropher Zellen, die durch Genmutation erzeugt werden, und zur Ermittlung der Überlebensrate anzulegen. Bei Versuchen, die Marker wie *hom* 3-10 mit einer geringen Mutationsrate verwenden, ist die Anzahl gleich behandelter Platten zu erhöhen, um statistisch relevante Daten zu erhalten.

#### Versuchsdurchführung

Die Behandlung von *S. cerevisiae*-Stämmen wird im allgemeinen mit einem Flüssigttest unter Verwendung von stationären oder wachsenden Zellen durchgeführt. Das Ausgangsexperiment sollte mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. 1 bis 5 mal 10<sup>7</sup> Zellen /ml werden bis zu 18 Stunden bei 28 bis 37 °C gegenüber der Prüfsubstanz unter Schütteln exponiert. Während der Behandlung wird eine angemessene Menge des exogenen metabolisierenden Systems beigefügt. Nach der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf einem geeigneten Kulturmedium ausgesät. Nach der Inkubation wird die Überlebensrate und die Genmutationsinduktion auf den Platten quantitativ erfaßt.

Sind die Befunde des ersten Experiments negativ, so ist ein weiterer Versuch durchzuführen mit Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Sind die Befunde des ersten Experiments positiv, so ist dies durch einen geeigneten unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2.

## DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Anzugeben sind die Anzahl der gezählten Konidien, die Anzahl der Mutanten, die Überlebensrate und die Mutantenhäufigkeit. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen. Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Methoden erfolgen.

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendeter Stamm;
- Versuchsbedingungen: Zellen der stationären Phase oder wachsende Zellen, Medienzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -dauer, Stoffwechselaktivierungssysteme;
- Behandlungsbedingungen: Konzentrationen, Behandlungsverfahren und -dauer, Behandlungstemperatur, Positiv- und Negativkontrollen;
- Anzahl der gezählten Kolonien, Anzahl der Mutanten, Überlebensrate und Mutantenhäufigkeit, ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung, statistische Auswertung der Daten;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

#### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

MITOTISCHE REKOMBINATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Bei *Saccharomyces cerevisiae* läßt sich mitotische Rekombination zwischen verschiedenen Genen (oder allgemeiner zwischen einem Gen und dem Zentromer) und innerhalb eines Gens feststellen. Im ersten genannten Fall wird sie mitotisches Crossing-over genannt und erzeugt Reziprokprodukte, während sie im letzteren Fall meistens keine reziproken Ergebnisse hat und als Genkonversion bezeichnet wird. Das Crossing-over wird anhand der Bildung rezessiver homozygoter Kolonien oder Sektoren in einem heterozygoten Stamm bestimmt, die Genkonversion hingegen anhand der Bildung prototropher Revertanten mit zwei verschiedenen defekten Allelen des gleichen Gens in einem auxotrophen heteroallelen Stamm. Die am häufigsten zur Ermittlung der mitotischen Genkonversion verwendeten Stämme sind D<sub>4</sub> (heteroallel für *ade 2* und *trp 5*), BZ<sub>34</sub> (heteroallel für *arg 4*), D<sub>7</sub> (heteroallel für *trp 5*) und JD1 (heteroallel für *his 4* und *trp 5*). Mitotisches Crossing-over, das rote („red“) und rosafarbene („pink“) homozygote Sektoren erzeugt, läßt sich mit D<sub>5</sub> oder mit D<sub>7</sub> (der auch zur Messung von mitotischer oder Genkonversion und von Rückmutationen an *ihv 1-92* dient) ermitteln. Beide Stämme sind heteroallel in bezug für einander komplementierende Allele von *ade 2*.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- und Bezugssubstanzen sind unmittelbar vor der Prüfung in einem geeigneten Lösungsmittel zu lösen. Bei wasserunlöslichen organischen Verbindungen sind organische Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verwenden, wobei die Konzentration 2% v/v nicht überschreiten darf. Die Endkonzentration des Lösungsmittels soll die Überlebensrate und die Wachstumseigenschaften der Zellen nicht signifikant verändern.

*Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Zellen mit den Prüfsubstanzen soll sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion aus Lebern von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien vorbehandelt wurden. Auch andere Arten, Gewebe, post-mitochondriale Fraktionen oder Verfahren können sich für die Stoffwechselaktivierung eignen.

*Prüfbedingungen**Versuchsstämme*

Die am häufigsten verwendeten Stämme sind die diploiden Stämme D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>7</sub> und JD1. Auch andere Stämme können sich eignen.

## Medien

Zur Bestimmung der Überlebensrate und der Häufigkeit der mitotischen Rekombination werden geeignete Kulturmedien verwendet.

## Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Positivkontrollen, unbehandelte und Lösungsmittelkontrollen sind gleichzeitig durchzuführen. Für jeden spezifischen Rekombinationsendpunkt sind geeignete Bezugssubstanzen zu verwenden.

## Konzentrationen

Mindestens fünf deutlich unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz sind zu verwenden. Unter anderem sind Zytotoxizität und Löslichkeit zu berücksichtigen. Die niedrigste Konzentration darf sich in keiner Weise auf die Überlebensrate der Zellen auswirken. Bei toxischen Substanzen sollte die höchste geprüfte Konzentration die Überlebensrate nicht unter 5 bis 10 % senken. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

Zellen können entweder in der stationären oder in der Wachstumsphase bis zu 18 Stunden gegenüber der Prüfsubstanz exponiert werden. Wird für einen längeren Zeitraum exponiert, sind die Kulturen mikroskopisch auf Sporenbildung zu untersuchen, da deren Vorhandensein den Versuch invalidiert.

## Inkubationsbedingungen

Die Platten werden im Dunkeln vier bis sieben Tage lang bei 28 bis 30 °C inkubiert. Die zur Bestimmung der durch mitotisches Crossing-over erzeugten roten („red“) und rosafarbenen („pink“) homozygoten Sektoren verwendeten Schalen sind weitere ein bis zwei Tage gekühlt (4 °C) zu halten, um die Entwicklung der entsprechenden pigmentierten Kolonien zu ermöglichen; erst dann sollte die quantitative Erfassung erfolgen.

## Häufigkeit von Spontanmutationen

Es sind Subkulturen zu verwenden, bei denen sich die Häufigkeit spontaner mitotischer Rekombinationen im üblichen Rahmen bewegen.

## Anzahl der Platten

Mindestens 3 Platten pro Konzentration sind für den Nachweis prototropher Zellen, die durch mitotische Genkonversion erzeugt wurden, und zur Bestimmung der Überlebensrate anzulegen. Bei der Bestimmung der durch mitotisches Crossing-over erzeugten rezessiven Homozygotie ist die Anzahl an Platten zu erhöhen, um eine geeignete Anzahl an Kolonien zu erhalten.

## Versuchsdurchführung

Die Behandlung *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgt gewöhnlich in einem Flüssigtest unter Verwendung von stationären oder wachsenden Zellen. Das Ausgangsexperiment sollte mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. 1 bis 5 mal  $10^7$  Zellen/ml werden bis zu 18 Stunden bei 28 bis 37 °C gegenüber der Prüfsubstanz unter Schütteln exponiert. Während der Behandlung wird eine angemessene Menge des exogenen metabolisierenden Systems zugegeben. Nach der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf ein geeignetes Kulturmedium ausgesät. Nach der Inkubation wird die Überlebensrate und die Induktion mitotischer Rekombinationen quantitativ erfaßt.

Sind die Befunde des ersten Experiments negativ, so ist ein weiterer Versuch durchzuführen mit Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Sind die Befunde des ersten Experiments positiv, so ist dies durch einen geeigneten unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2.

## DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der gezählten Konidien, der Anzahl der Rekombinationen, die Überlebensrate und die Rekombinationshäufigkeit darzustellen.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendeter Stamm;
- Versuchsbedingungen: Zellen der stationären Phase oder wachsende Zellen, Medienzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -dauer, Stoffwechselaktivierungssystem;
- Behandlungsbedingungen: Konzentrationen, Behandlungsverfahren und -dauer, Behandlungstemperatur, Positiv- und Negativkontrollen;
- Anzahl der gezählten Kolonien, Anzahl der Rekombinanten, Überlebensrate und Rekombinationshäufigkeit, ggf. Dosis-Wirkungsbeziehung, statistische Auswertung der Daten;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## IN VITRO-SÄUGETIERZELLEN — GEN-MUTATIONSTEST

**1. METHODE****1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Säugerzelllinien können zur Feststellung chemisch induzierter Mutationen verwendet werden. Häufig verwendete Zelllinien sind Maus-Lymphomazellen L5178Y sowie die Zelllinien CHO und V-79 des chinesischen Hamsters. Mit diesen Zelllinien werden in den gebräuchlichsten Systemen Mutationen an den Loci für Thymidinkinase (TK), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)<sup>(1)</sup> und  $NA^+/K^+$ -ATPhase nachgewiesen. Mit den TK- und HPRT-Mutationssystemen lassen sich Basenpaarmutationen, Rasterschubmutationen und kleine Deletionen ermitteln, mit dem  $NA^+/K^+$ -System nur Basenpaarmutationen.

Zellen, die aufgrund der Vorwärtsmutation  $TK^+ \rightarrow TK^-$  Thymidinkinase (TK)-defizient sind, sind gegenüber Bromdesoxyuridin (BrdU), Fluordesoxyuridin (FdU) oder Trifluorthymidin (TFT) resistent, da diese Antimetaboliten dann nicht durch das „Salvage“-Enzymsystem Thymidinkinase in Zellnukleotide eingebaut werden. Bei Anwesenheit von Thymidinkinase werden BrdU, FdU oder TFT jedoch in die Nukleotide eingebaut, was zur Hemmung des Zellstoffwechsels und zu Zytotoxizität führt. So können die Mutantenzellen bei Anwesenheit von BrdU, FdU oder TFT proliferieren, während die normalen Zellen, die Thymidinkinase enthalten, nicht dazu in der Lage sind.

In ähnlicher Weise werden Zellen, die eine defekte HPRT besitzen, durch Resistenz gegenüber 8-Azaguanin (AG) oder 6-Thioguanin (TG) selektiert. Zellen mit veränderter  $NA^+/K^+$ -APTase werden durch Resistenz gegenüber Ouabain selektiert.

Die Zytotoxizität wird durch die substanzabhängige Verringerung der Koloniebildungsrate (Klonierungseffizienz) oder die Veränderung der Wachstumsrate der Kultur bestimmt. Die Mutationsrate läßt sich bestimmen, indem man eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit den selektierenden Agens — zur Bestimmung der Mutantenzahl — und auf ein Medium ohne selektierendes Agens — zur Bestimmung der überlebenden Zellen — ausplattiert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutationsrate wird aus der Mutantenzahl pro überlebensfähige Koloniezahl berechnet.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode****Vorbereitung****Zellen**

Für diesen Versuch stehen eine Reihe von Zelllinien zur Verfügung. Dazu gehören Subklone von L5178Y CHO-Zellen oder V-79-Zellen mit einer nachgewiesenen Empfindlichkeit für chemische Mutagene, einer hohen Klonierungseffizienz und einer geringen Spontanmutationshäufigkeit. Die Zellen können periodisch auf Karyotypstabilität überprüft werden; eine Überprüfung auf Mycoplasmaverunreinigung ist ratsam. Es können auch andere Zelltypen verwendet werden, sofern ihre Validität für Versuche zu chemisch induzierten Genmutationen ausreichend dokumentiert ist.

<sup>(1)</sup> Früher HGPRT.

### Medium

Es sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (z. B. Temperatur, verwendete Kulturgefäße, CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und Feuchtigkeit) zu wählen. Die Medien und Seren sollten den im Versuch verwendeten Selektivsystemen und Zelltypen entsprechen.

### Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanzen können vor Behandlung der Zellen in Kulturmedium oder in geeigneten Lösemitteln gelöst oder suspendiert werden. Die Endkonzentration des Lösungsmittelsystems soll die Überlebens- oder die Wachstumsrate der Zellen nicht beeinflussen.

### Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz erfolgt mit oder ohne Zusatz eines exogenen metabolisierenden Systems. Werden Zelltypen mit endogener Metabolisierungsaktivität verwendet, sollten Umsetzungsraten und Eigenschaften dieser Metabolisierung bekannt sein, daß sie Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

### Versuchsbedingungen

#### Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen

Für jeden Versuch sind Positivkontrollen, und zwar sowohl eine direkt wirksame Verbindung als auch eine Verbindung, die eine Stoffwechselaktivierung benötigt, heranzuziehen. Auch eine Negativ-(Lösungsmittel-) Kontrolle ist zu verwenden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen verwendet werden:

- direkt wirksame Verbindungen:
  - Ethyl-methansulfonat,
  - Hycanthon,
- indirekt wirksame Verbindungen:
  - 2-Acetylaminofluoren,
  - 7, 12-Dimethylbenzanthracen,
  - N-Nitrosodimethylamin.

Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz.

### Konzentrationen

Es sind mehrere Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Diese Konzentrationen sollten eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung ausüben, wobei die höchste Konzentration eine geringe Überlebensrate bewirkt und die Überlebensrate in der niedrigsten Konzentration etwa der in der Negativkontrolle entspricht. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfsubstanzkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

### Versuchsdurchführung

Die Anzahl der pro Kultur verwendeten Zellen sollte in Relation zur Spontanmutationshäufigkeit stehen; als allgemeine Richtlinie gilt, daß die Anzahl der lebensfähigen Zellen dem zehnfachen Kehrwert der Spontanmutationshäufigkeit entsprechen soll.

Die Exposition der Zellen sollte einen angemessenen Zeitraum umfassen, in den meisten Fällen reichen zwei bis fünf Stunden aus. Zellen ohne ausreichende eigene Stoffwechselaktivität sollten sowohl mit als auch ohne ein geeignetes Stoffwechselaktivierungssystem gegenüber der Prüfsubstanz exponiert werden. Nach dem Ende der Expositionszeit wird die Prüfsubstanz von den Zellen abgewaschen; die Zellen werden kultiviert, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Expression des Mutantenphänotyps zu ermöglichen.

Nach dem Ende der Expressionszeit, die ausreichen sollte, um eine annähernd optimale phänotypische Expression induzierter Mutanten zu ermöglichen, werden die Zellen in Medium mit und ohne selektierende Agenzien zur Bestimmung der Mutantenzahl und der Überlebensrate kultiviert.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

**2. DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Dabei sind Mutationsinduktion und Überlebensrate pro Platte für die Prüfsubstanz und die Kontrollen anzugeben. Auch die Durchschnittszahl der Kolonien pro Platte und die Standardabweichung sind zu vermerken. Die Mutationsrate ist als Anzahl der Mutanten pro Anzahl der überlebenden Zellen auszudrücken. Überlebensrate und Klonierungseffizienz sind als Prozentsatz des Kontrollwertes auszudrücken.

Die Auswertung der Daten sollte mit geeigneten statistischen Verfahren erfolgen.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Zelllinie, Anzahl der Zellkulturen, Verfahren zur Erhaltung der Zellkulturen;
- Versuchsbedingungen: Medienzusammensetzung, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendete Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel) Behandlungsdauer, Zelldichte während der Behandlung, Art des verwendeten Säugetier-Stoffwechselaktivierungssystems, Positiv- und Negativkontrollen, verwendetes selektierendes Agens;
- Begründung für die Wahl der Konzentrationen;
- das zur Zählung der Überlebenden und mutierten Zellen verwendete Verfahren;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

DNS-SCHÄDIGUNG UND -REPARATUR — UNPLANMÄSSIGE DNS-SYNTHESE (UDS) — SÄUGETIERZELLEN —  
IN VITRO

1. METHODE

1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Mit dem Test zur unplanmäßigen DNS-Synthese (UDS)-Test wird die DNS-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen des Abschnittes eines DNS-Stranges gemessen, in dem sich die durch chemische und physikalische Agenzien induzierte Schädigung befindet. Der UDS-Test eignet sich zur Ermittlung der „long patch“-Reparatur. Die „short patch“-Reparatur oder Insertion einzelner Nukleotidbasen läßt sich damit nicht oder nur mit einem sehr geringen Empfindlichkeitsgrad feststellen. Der Test beruht auf dem Einbau von tritiummarkiertem Thymidin ( $^3\text{H-TdR}$ ) in die DNS von Säugetierzellen, die sich außerhalb der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die  $^3\text{H-TdR}$ -Aufnahme läßt sich durch Autoradiographie oder eine Flüssigkeitsszintillationszählung (LSC = Liquid Scintillation Counting) der DNS behandelte Zellen bestimmen. Säugetierzellen in Kultur werden, sofern es sich nicht um primäre Rattenhepatozyten handelt, mit der Prüfsubstanz mit oder ohne Zusatz eines exogenen Stoffwechselaktivierungssystems behandelt. Die UDS läßt sich auch in *in vivo*-Systemen messen.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- oder Bezugssubstanzen sollten in Medium oder in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert werden. Die endgültige Lösungsmittelkonzentration darf die Überlebensrate der Zellen nicht beeinträchtigen.

In diesem Versuch können primäre Kulturen von Rattenhepatozyten, menschlichen Lymphozyten oder etablierten Zelllinien (z. B. menschliche diploide Fibroblasten) verwendet werden.

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen.

*Versuchsbedingungen*

**Anzahl der Kulturen**

Für jeden experimentellen Punkt werden mindestens zwei Zellkulturen für die Autoradiographie verwendet und mindestens sechs Zellkulturen (wenn es wissenschaftlich begründbar ist, können weniger verwendet werden) für das LSC-Verfahren.

**Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen**

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und (unbehandelte und/oder Lösungsmittel) Negativkontrollen mit oder ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems anzulegen.

Beispiele für die Positivkontrollen für den Rattenhepatozytenversuch sind: 7,12-Dimethylbenzanthracen (7,12-DMBA) oder 2-Azetylamino-fluoren (2-AAF). Werden etablierte Zelllinien verwendet, kann 4-Nitochinolin-N-oxid (4-NAO) als Positivkontrolle für Autoradiographie- und LSC-Versuche ohne Stoffwechselaktivierung dienen. Ein Beispiel für eine Positivkontrolle bei Verwendung von Stoffwechselaktivierungssystemen ist N-Dimethylnitrosamin.

#### Konzentrationen

Es sind mehrere unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Die höchste Konzentration sollte zytotoxisch wirken. Relativ wasserunlösliche Verbindungen sind bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### Zellen

Die Kulturen sind unter geeigneten Bedingungen (Wachstumsmedien, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu halten. Etablierte Zelllinien sind periodisch auf *Mycoplasma*-Verunreinigung zu überprüfen. Weiterhin ist eine periodische Überprüfung der Zellen auf Karyotypstabilität ratsam.

#### Stoffwechselaktivierung

Bei primären Hepatozytenkulturen wird kein exogenes Stoffwechselaktivierungssystem verwendet.

Die Behandlung etablierter Zelllinien und Lymphozyten mit der Prüfsubstanz erfolgt sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems.

#### Versuchsdurchführung

##### Vorbereitung der Kulturen

Etablierte Zelllinien werden aus Stammkulturen gewonnen (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in Kulturgefäße in angemessener Zelldichte überimpft und bei 37 °C inkubiert.

Kurzzeitkulturen von Rattenhepatozyten werden dadurch angelegt, daß man es frisch gewonnenen Hepatozyten ermöglicht, sich in einem geeigneten Medium an die Wachstumsfläche festzuheften.

Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden mit geeigneten Verfahren angelegt.

#### Behandlung der Kulturen mit der Prüfsubstanz

##### Primäre Rattenhepatozyten

Frisch isolierte Rattenhepatozyten werden in einem <sup>3</sup>H-TdR enthaltenden Medium während eines angemessenen Zeitraums mit der Prüfsubstanz behandelt. Nach Ende der Behandlung wird das Medium entfernt, die Zellen werden gewaschen, fixiert und getrocknet. Die Objektträger werden in Autoradiographieemulsion getaucht (alternativ dazu können „stripping“-Filme verwendet werden), „belichtet“, entwickelt, gefärbt und ausgewertet.

##### Etablierte Zelllinien und Lymphozyten

*Autoradiographieverfahren:* Die Zellkulturen werden jeweils während einer angemessenen Zeitdauer mit der Prüfsubstanz behandelt und dann mit <sup>3</sup>H-TdR behandelt. Die Zeiten richten sich nach Art der Substanz, Aktivität des Stoffwechselsystems und Zelltyp. Zur Ermittlung des UDS-Maximums ist <sup>3</sup>H-TdR entweder gleichzeitig mit der Prüfsubstanz oder innerhalb weniger Minuten danach zuzugeben.

Für welches dieser beiden Verfahren man sich entscheidet, hängt von der Möglichkeit einer Interaktion zwischen Prüfsubstanz und <sup>3</sup>H-TdR ab.

Um zwischen UDS und semikonservativer DNS-Replikation zu unterscheiden, kann letztere z. B. durch Verwendung eines argininfreien Mediums, durch geringen Serumgehalt oder Hydroxyharnstoff im Kulturmedium gehemmt werden.

*Messungen der UDS mit dem LSC-Verfahren:* Vor Behandlung mit der Prüfsubstanz sollte der Eintritt der Zellen in die S-Phase wie oben beschrieben blockiert werden. Anschließend sind die Zellen wie bei der Autoradiographie beschrieben mit der Prüfsubstanz zu behandeln. Nach Ende der Inkubationszeit extrahiert man die DNS aus den Zellen und bestimmt den gesamten DNS-Gehalt sowie die <sup>3</sup>H-TdR-Einbaurate.

Bei Verwendung nichtstimulierter menschlicher Lymphozyten erübrigen sich die oben genannten Verfahren zur Hemmung der semikonservativen DNS-Replikation.

*Analyse***Autoradiographiebestimmung**

Bei der Bestimmung der UDS an Zellen in Kultur werden die S-Phasen-Kerne nicht gezählt. Pro Konzentration sind bei der Zählung mindestens 50 Zellen zu erfassen. Die Objektträger sollten vor der Zählung kodiert werden. Auf jedem Objektträger sind mehrere weit auseinander liegende, nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Felder zu zählen. Das Ausmaß der Hintergrund-Markierung im Zytoplasma ist durch Zählung von drei Bereichen von der Größe eines Kerns im Zytoplasma jeder gezählten Zelle zu bestimmen.

**Bestimmungen mit dem LSC-Verfahren**

Bei Bestimmungen der UDS mit dem LSC-Verfahren ist eine angemessene Anzahl von Kulturen pro Konzentration und in den Kontrollen zu verwenden.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

**2. DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen.

**2.1. Autoradiographiebestimmungen**

Das Ausmaß des  $^3\text{H}$ -TdR-Einbaus im Zytoplasma und die Anzahl der Körner über dem Zellkern sind getrennt zu vermerken.

Zur Beschreibung der Verteilung der  $^3\text{H}$ -TdR-Hintergrundmarkierung und der Anzahl der Granula pro Kern können Mittelwert, Medianwert und Modalwert verwendet werden.

**2.2. Bestimmungen mit dem LSC-Verfahren**

Bei der Bestimmung mit dem LSC-Verfahren ist der  $^3\text{H}$ -TdR-Einbau in dpm/ $\mu\text{g}$  DNS anzugeben. Zur Beschreibung der Einbauverteilung kann der Mittelwert für dpm/ $\mu\text{g}$  DNS mit Standardabweichung verwendet werden.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Zellen, Dichte und Passagenanzahl und Zeitpunkt der Behandlung, Anzahl der Zellkulturen;
- zur Erstellung der Zellkulturen verwendete Verfahren einschließlich Medium, Temperatur und  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen;
- Prüfsubstanz, Lösungsmittelkonzentrationen und Begründung für die Wahl der in dem Versuch verwendeten Konzentrationen;
- nähere Angaben zu den Stoffwechselaktivierungssystemen;
- Behandlungsplan;
- Positiv- und Negativkontrollen;

- verwendetes Autoradiographieverfahren;
- zur Blockierung des Eintritts der Zellen in die S-Phase verwendete Verfahren;
- zur DNS-Extraktion und Bestimmung des gesamten DNS-Gehalts im Rahmen des LSC-Verfahrens verwendete Methoden;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## IN VITRO-SCHWESTERCHROMATIDAUSTAUSCH-TEST

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Bei dem Schwesterchromatidaustausch — (SCE = Sister Chromatid Exchange) — Test handelt es sich um einen Kurzzeittest zur Ermittlung reziproker Austausche der DNS zwischen zwei Schwesterchromatiden eines sich replizierenden Chromosoms. SCE stellt den Austausch von DNS-Replikationsprodukten an anscheinend homologen Loci dar. Der Austauschprozeß umfaßt vermutlich Bruch und Reunion der DNS-Stränge, aber über seine Molekulargrundlage ist wenig bekannt. Zur Erkennung des SCE ist es erforderlich, die Schwesterchromatiden unterschiedlich zu markieren, was sich durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die Chromosomen-DNS während eines oder zwei Zellzyklen erreichen läßt.

Die Säugetierzellen werden *in vitro* mit und ohne Zusatz eines exogenen Säuger-Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt und während eines oder zweier Replikationszyklen in BrdU enthaltendem Medium kultiviert. Nach Behandlung mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin) zur Akkumulierung der Zellen in einem metaphasenähnlichen Stadium der Mitose (C-Metaphase) werden die Zellen gewonnen und Chromosomenpräparationen hergestellt.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

- Für diese Versuche können Primärkulturen (z. B. menschliche Lymphozyten) oder etablierte Zelllinien (z. B. Ovarzellen des Chinesischen Hamsters) verwendet werden. Zelllinien sind auf *Mycoplasma*-Verunreinigung zu überprüfen;
- der Versuch ist mit geeigneten Kulturmedien und unter angemessenen Inkubationsbedingungen (z. B. Temperatur, Kulturgefäße, CO<sub>2</sub>-Konzentration und Feuchtigkeit) durchzuführen;
- die Prüfsubstanzen können in Kulturmedien oder in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert werden, bevor die Behandlung der Zellen beginnt. Die endgültige Konzentration eines Lösungsmittels im Kultursystem darf die Lebensfähigkeit der Zellen bzw. die Wachstumsrate nicht signifikant beeinflussen. Die Beeinflussung der SCE-Häufigkeit ist durch eine Lösungsmittelkontrolle zu überwachen;
- die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit und ohne Zusatz eines exogenen Säuger-Metabolisierungssystems erfolgen. Werden Zelltypen mit endogener Stoffwechselaktivität verwendet, sollte bekannt sein, daß die Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

*Versuchsbedingungen*

## Anzahl der Kulturen

Für jeden experimentellen Punkt sind mindestens zwei Kulturen zu verwenden.

### Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen

Bei jedem Versuch sind Positivkontrollen heranzuziehen sowohl unter Verwendung einer direkt wirksamen Substanz als auch einer Substanz, die eine Stoffwechselaktivierung erfordert. Auch eine Lösungsmittelkontrolle ist zu verwenden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen verwendet werden:

- direkt wirksame Verbindungen:
  - Ethyl-Methansulfonat,
- indirekt wirksame Verbindungen:
  - Cyclophosphamid.

Gegebenenfalls kann eine zusätzliche Positivkontrolle mit einer Substanz durchgeführt werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die Prüfsubstanz.

### Konzentrationen

Es sind mindestens drei geeignete Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Die höchste Konzentration sollte eine signifikant toxische Wirkung ausüben, muß jedoch noch eine adäquate Zellreplikation zulassen. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfsubstanzkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

### Versuchsdurchführung

#### Vorbereitung der Kulturen

Zellen etablierter Zelllinien werden aus Stammkulturen isoliert (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in Kulturgefäße in geeigneter Dichte ausgesät und bei 37 °C inkubiert.

Bei einschichtigen Kulturen ist die Anzahl der Zellen pro Kulturgefäß so zu wählen, daß die Kulturen zum Zeitpunkt der Aufarbeitung zu nicht viel mehr als 50% konfluent sind. Die Zellen können auch in einer Suspensionskultur gehalten werden. Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden unter Verwendung geeigneter Verfahren mit heparinisiertem Blut angelegt und bei 37 °C inkubiert.

#### Behandlung

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase werden während einer angemessenen Zeitdauer mit der Prüfsubstanz behandelt. In den meisten Fällen reichen ein bis zwei Stunden aus, doch kann die Behandlungszeit in bestimmten Fällen auf maximal zwei vollständige Zellzyklen verlängert werden. Zellen ohne ausreichende Stoffwechselaktivität sind sowohl mit als auch ohne Zugabe eines geeigneten Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz zu behandeln. Nach Ende der Behandlungszeit wird durch Waschen der Zellen die Prüfsubstanz entfernt. Die Zellen werden während eines oder zweier Replikationszyklen in Anwesenheit von BrdU kultiviert. Alternativ kann die Behandlung der Zellen während der gesamten Kultivierungszeit von zwei Zellzyklen mit der Prüfsubstanz und BrdU gleichzeitig erfolgen.

Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden behandelt, während sie sich in semisynchronem Zustand befinden.

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgt zum Zeitpunkt ihrer zweiten Teilung nach der Behandlung, wobei sicherzustellen ist, daß die empfindlichsten Stadien des Zellzyklus mit der Substanz behandelt wurden. An allen Kulturen, denen BrdU beigegeben wurde, sind die entsprechenden Vorrichtungen bis zur Gewinnung der Zellen im Dunkeln oder bei entsprechend schwacher Beleuchtung vorzunehmen, um die Photolyse von BrdU-haltiger DNS so gering wie möglich zu halten.

#### Gewinnung der Zellen

Ein bis vier Stunden vor der Aufarbeitung werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin) behandelt. Jede Kultur wird einzeln gewonnen und getrennt zur Chromosomenpräparation aufgearbeitet.

#### Präparation und Färbung von Chromosomen

Die Chromosomenpräparate werden mit zytogenetischen Standardverfahren angefertigt. Die Färbung der Objektträger zur Darstellung der SCE ist mit verschiedenen Verfahren möglich (z. B. dem Fluoreszenzplus-Giems-Verfahren).

### Analyse

Die Anzahl der zu analysierenden Zellen ist unabhängig von der spontanen SCE-Häufigkeit. Normalerweise werden die SCE in mindestens 25 gut gespreiteten Metaphasen pro Kultur gezählt. Vor der Auswertung werden die Objektträger kodiert. Bei Verwendung menschlicher Lymphozyten wertet man nur die Metaphasen mit 46 Zentromeren aus. Bei Verwendung etablierter Zelllinien werden nur Metaphasen ausgewertet, deren Zentromerzahl dem häufigsten Wert  $\pm 2$  entspricht. Er ist anzugeben, ob Farbsprünge im Zentromerbereich als SCE gezählt wurden oder nicht. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Für alle behandelten und Kontrollkulturen sind die SCE-Anzahl pro Metaphase und die SCE-Anzahl pro Chromosom für jede Kultur getrennt anzugeben.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

- verwendete Zellen, Zellkulturbedingungen;
- Versuchsbedingungen: verwendete Medien, CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendete Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, verwendetes Spindelgift (Konzentration und Behandlungsdauer), Typ des verwendeten Säugetier-Metabolisierungssystems, Positiv- und Negativkontrollen;
- Anzahl der Zellkulturen für jeden experimentellen Punkt;
- nähere Angaben über die Herstellung der Chromosomenpräparate;
- Anzahl der analysierten Metaphasen (die Werte sind für jede Kultur getrennt anzugeben);
- SCE-Anzahl pro Metaphase und pro Chromosom (die Werte sind für jede Kultur getrennt anzugeben);
- Kriterien für die Auswertung der SCE;
- Begründung der Dosierungswahl;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

TEST ZUR ERFASSUNG GESCHLECHTSGEBUNDENER REZESSIVER LETALMUTATIONEN AN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. **METHODE**

1.1. **Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.2. **Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.3. **Bezugssubstanzen**

Keine.

1.4. **Prinzip der Methode**

Mit dem Test zur Erfassung geschlechtsgebundener rezessiver Letalmutationen (sex-linked recessive lethal test = SLRL-Test) an *Drosophila melanogaster* lassen sich Mutationen — sowohl Punktmutationen als auch kleine Deletionen — in der Keimbahn des Insektes feststellen. Es handelt sich um einen Vorwärtsmutationentest, mit dem eine Untersuchung auf Mutationen an etwa 800 Loci auf dem X-Chromosom (etwa 80% aller X-Chromosom-Loci) möglich ist. Das X-Chromosom enthält etwa ein Fünftel des gesamten haploiden Genoms.

Mutationen im X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* werden in männlichen Trägern des Mutantengens phänotypisch exprimiert. Wenn eine letale Mutation in hemizygotem Zustand vorliegt, fehlt eine der beiden Klassen männlicher Nachkommen, die ein heterozygotes Weibchen normalerweise hervorbringt. Im SLRL-Test erkennt man diese Tatsachen mit Hilfe besonders markierter und angeordneter Chromosomen.

1.5. **Qualitätskriterien**

Keine.

1.6. **Beschreibung der Methode**

*Vorbereitung*

**Zuchten**

Es können Männchen einer genau definierten Wildtypzucht und Weibchen der Zucht Muller-5 verwendet werden. Auch die Verwendung von anderen entsprechend markierten Weibchen mit multiplen invertierten X-Chromosomen ist möglich.

**Prüfsubstanz**

Die Prüfsubstanzen sind in Wasser zu lösen. Wasserunlösliche Substanzen können in geeigneten Lösungsmitteln (z. B. einer Mischung aus Ethanol und Tween-60 oder 80) gelöst oder suspendiert und dann vor der Verabreichung mit Wasser oder Kochsalzlösung verdünnt werden. Die Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel ist zu vermeiden.

**Anzahl der Tiere**

Empfindlichkeit und Signifikanzgrad des Tests sind vorher festzulegen. Die Anzahl der zu analysierenden behandelten Chromosomen hängt in hohem Maß von der spontanen Mutationsrate in entsprechenden Kontrollen ab.

**Behandlung**

Die Verabreichung kann oral, durch Injektion oder durch Exposition gegenüber Gasen oder Dämpfen erfolgen. Bei oraler Verabreichung kann die Prüfsubstanz in Zuckerlösung gegeben werden. Erforderlichenfalls können die Substanzen in einer 0,7%igen NaCl-Lösung gelöst und in Thorax oder Abdomen injiziert werden.

**Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen**

Negativ- (Vehikel-) und Positivkontrollen sind zu verwenden. Stehen jedoch entsprechende Laborkontrollen zur Verfügung, sind keine gleichzeitigen Kontrollen erforderlich.

### Konzentrationen

Es sind drei Konzentrationen zu verwenden. Zur vorläufigen Abschätzung kann eine einzige Konzentration verwendet werden, und zwar entweder die höchste noch verträgliche Konzentration der Prüfsubstanz oder eine Konzentration, die gewisse Toxizitätsanzeichen hervorruft. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung gegenüber der höchstmöglichen Konzentration erfolgen.

### Versuchsdurchführung

Wildtypmännchen (3 bis 5 Tage alt) werden mit der Prüfsubstanz behandelt und einzeln mit mehreren jungfräulichen Weibchen aus der Muller-5-Zucht oder aus einer anderen entsprechend markierten Zucht (mit multiplen invertierten X-Chromosomen) gepaart. Die Weibchen werden alle zwei bis drei Tage durch neue jungfräuliche Tiere ersetzt, um den gesamten Keimzellzyklus abzudecken. Durch die Untersuchung der Nachkommen dieser Weibchen werden Letaleffekte in reifen Spermien, Spermatiden des mittleren oder späten Stadiums, frühen Spermatiden, Spermatozyten und Spermatogonien der behandelten Männchen erfaßt.

Heterozygote F<sub>1</sub>-Weibchen aus den obigen Kreuzungen werden einzeln (d. h. ein Weibchen pro Flasche) mit ihren Brüdern gepaart. In der F<sub>2</sub>-Generation wird in jeder Kultur festgestellt, ob Wildtypmännchen auftreten oder nicht. Gelangt man aufgrund der Tatsache, daß in einer Kultur keine F<sub>2</sub>-Männchen mit dem behandelten Chromosom (Wildtyp) beobachtet werden, zu der Annahme, daß das F<sub>1</sub>-Weibchen Träger eines Letalgens im väterlichen X-Chromosom ist, sind die Töchter dieses Weibchens mit dem gleichen Genotyp zu testen, um festzustellen, ob die Letalität auch in der nächsten Generation wieder auftritt.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Anzugeben ist die Anzahl der getesteten X-Chromosomen, die Anzahl der unfruchtbaren Männchen und die Anzahl der Letalmutationen für jede Konzentration, für jede Paarungsperiode und jedes behandelte Männchen. Auch sind Cluster verschiedener Größen pro Männchen anzugeben. Die Versuchsergebnisse sind in einem getrennten Versuch zu bestätigen.

Bei der Auswertung der SLRL-Tests sind geeignete statistische Verfahren zu verwenden. Cluster-Bildung rezessiver Letalmutationen, die von einem Männchen ausgehen, sind mit einem geeigneten statistischen Verfahren zu untersuchen und auszuwerten.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Zucht: verwendete *Drosophilazuchten* oder -stämme, Alter der Insekten, Anzahl der behandelten Männchen, Anzahl der sterilen Männchen, Anzahl der etablierten F<sub>2</sub>-Kulturen, Anzahl der F<sub>2</sub>-Kulturen ohne Nachkommen, Anzahl der in den einzelnen Keimzellstadien festgestellten Chromosomen mit einer Letalmutation;
- Kriterien für die Festlegung der Größe der behandelten Gruppen;
- Versuchsbedingungen: eingehende Beschreibung des Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplans, Expositionskonzentrationen, Toxizitätsdaten, ggf. Negativ-(Lösungsmittel-) und Positivkontrollen;
- Kriterien für die Erfassung der Letalmutationen;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## IN VITRO-ZELLTRANSFORMATIONSTEST

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Mit Säugetierzell-Kultursystemen können durch chemische Substanzen induzierte phänotypische Veränderungen *in vitro* ermittelt werden, die mit malignen Transformationen *in vivo* in Zusammenhang gebracht werden. Häufig verwendete Zellen sind: C3H10T <sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 3T3, SHE, Fisher-Ratten-Zellen. Die Tests beruhen auf Veränderungen der Zellmorphologie, Fokusbildung oder der Eigenschaft, im Weichagar wachsen zu können. Mit einigen weniger häufig verwendeten Systemen lassen sich andere physiologische oder morphologische Veränderungen der Zellen nach Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen feststellen. Für keinen der *in-vitro*-Test-Endpunkte wurde eine kausale Beziehung zu Krebs nachgewiesen. Mit einigen der Testsysteme lassen sich Tumorpromotoren ermitteln. Die Zytotoxizität kann festgestellt werden anhand der Auswirkung der Prüfsubstanz auf das Koloniebildungsvermögen (Klonierungseffizienz) oder die Wachstumsraten der Kulturen. Durch Ermittlung der Zytotoxizität kann man feststellen, ob die Exposition gegenüber der Prüfsubstanz toxikologisch relevant war, man kann damit jedoch nicht in allen Versuchen die Transformationshäufigkeit berechnen, da bei einigen längere Inkubationszeiten und/oder Neuplattierungen erforderlich sind.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

## Zellen

Je nach verwendetem Transformationstest stehen verschiedene Zelllinien oder primäre Zellen zur Verfügung. Der Untersucher muß sicherstellen, daß die Zellen in dem durchzuführenden Versuch nach der Exposition gegenüber bekannten Karzinogenen die entsprechenden phänotypischen Veränderungen aufweisen und daß Validität und Zuverlässigkeit des Tests in seinem Labor nachgewiesen und dokumentiert wurden.

## Medien

Die Medien und Versuchsbedingungen müssen für den durchzuführenden Transformationsversuch geeignet sein.

## Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanzen können in einem Kulturmedium oder in geeigneten Vehikeln gelöst oder suspendiert werden, bevor die Behandlung der Zellen beginnt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels im Kultursystem darf weder die Überlebensrate noch die Wachstumsrate der Zellen oder die Transformationsinzidenz beeinflussen.

## Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit und ohne Zusatz eines exogenen Säugetier-Metabolisierungssystems erfolgen. Werden Zelltypen mit endogener Stoffwechselaktivität verwendet, sollte bekannt sein, daß diese Zellen Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

### *Versuchsbedingungen*

#### Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen

Jeder Versuch sollte Positivkontrollen umfassen unter Verwendung sowohl einer direkt wirkenden Substanz als auch einer Substanz, bei der eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist. Auch eine Negativ-(Vehikel-)Kontrolle sollte angelegt werden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen dienen:

- Direkt wirksame Verbindungen:
  - Ethyl-Methansulfonat
  - $\beta$ -Propiolacton,
- Verbindungen, bei denen eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist:
  - 2-Acetylaminofluoren,
  - 4-(Dimethylamino)-azobenzol,
  - 7,12-Dimethylbenzanthracen.

Gegebenenfalls ist eine weitere Positivkontrolle erforderlich, die der gleichen chemischen Klasse angehört, wie die zu untersuchende Substanz.

#### Konzentrationen

Es sind mehrere Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Diese Konzentrationen sollten eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung ausüben, wobei die höchste Konzentration eine geringe Überlebensrate in der niedrigsten Konzentration etwa der in der negativen Kontrolle entspricht. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### *Versuchsdurchführung*

Die Zellen sind je nach verwendetem Testsystem während einer angemessenen Zeitdauer zu exponieren; bei längerer Exposition kann deshalb eine Neudosierung mit Erneuerung des Mediums (und ggf. des Stoffwechselaktivierungs-Gemischs) erforderlich werden. Die Behandlung der Zellen ohne ausreichende eigene Stoffwechselaktivität mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungs-Systems erfolgen.

Nach Ende der Behandlungszeit wird die Prüfsubstanz durch Waschen von den Zellen entfernt. Dann werden die Zellen unter Bedingungen kultiviert, die es ermöglichen, den veränderten Phänotyp zu erfassen. Anschließend wird die Transformationsinzidenz ermittelt. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Je nach Versuch sind zum Beispiel Anzahl der Platten, Platten mit Transformation oder Anzahl der transformierten Zellen anzugeben. Gegebenenfalls ist die Überlebensrate als Prozentsatz der Überlebensrate in den Kontrollkulturen und die Transformationshäufigkeit als Anzahl der transformierten Zellen pro Anzahl der überlebenden Zellen auszudrücken.

Die Daten sind unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren abzusichern.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendeter Zelltyp, Anzahl der Zellenkulturen, Zellkulturbedingungen;
- Versuchsbedingungen, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendetes Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, Behandlungsdauer und -häufigkeit, Zelldichte während der Behandlung, Art des verwendeten exogenen Stoffwechselaktivierungs-Systems, Positiv- und Negativkontrollen, genaue Beschreibung des zu erfassenden Phänotypes, ggf. verwendetes Selektivsystem, Begründung für die Wahl der Konzentrationen;

- 
- das zur Zählung der lebenden und transformierten Zellen verwendete Verfahren;
  - statistische Auswertung;
  - Diskussion der Ergebnisse;
  - Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

SÄUGER *IN VIVO*-DOMINANT-LETAL-TEST

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Dominante Letaleffekte bewirken den Tod des Embryos bzw. des Fötus. Die Induktion dominanter Letalgene durch Behandlung mit einer chemischen Substanz weist darauf hin, daß die Substanz das Keimgewebe der Tierart geschädigt hat. Man geht allgemein davon aus, daß dominante Letalgene auf Chromosomenschäden (strukturelle und numerische Anomalien) zurückgehen. Das Absterben des Embryos in behandelten Weibchen kann auch durch toxische Effekte bedingt sein.

Im allgemeinen werden die männlichen Tiere mit der Prüfsubstanz behandelt und dann mit unbehandelten jungfräulichen Weibchen gepaart. Die verschiedenen Keimzellstadien können durch Verwendung aufeinander folgender Paarungsintervalle getrennt getestet werden. Die Differenz zwischen der Anzahl der toten Implantate pro Weibchen in der behandelten Gruppe und der Anzahl toter Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe entspricht dem Postimplantationsverlust. Der Präimplantationsverlust kann abgeschätzt werden auf der Grundlage der *Corpora lutea* oder durch den Vergleich der Gesamtimplantate pro Weibchen in der behandelten und der Kontrollgruppe. Der gesamte dominante Letaleffekt entspricht der Summe der Prä- und Postimplantationsverluste. Die Berechnung des gesamten dominanten Letaleffekts beruht auf einem Vergleich der Zahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Versuchsgruppe mit der Zahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe. Eine Verringerung der Implantatenanzahl in bestimmten Paarungsgruppen kann darauf zurückzuführen sein, daß Zellen (z. B. Spermatozyten und/oder Spermatogonien) abgetötet wurden.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen sind möglichst in isotonischer Kochsalzlösung zu lösen oder zu suspendieren. Wasserunlösliche Substanzen können in geeigneten Vehikeln gelöst oder suspendiert werden. Das verwendete Vehikel darf weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben. Es sind frische Lösungs- oder Suspensionsansätze zu verwenden.

*Versuchsbedingungen**Verabreichungsweg*

Die Prüfsubstanz sollte im allgemeinen nur einmal verabreicht werden. Wenn toxikologische Gründe dafür sprechen, ist eine wiederholte Behandlung möglich. Die üblichen Verabreichungswege sind per os oder intraperitoneal. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

*Versuchstiere*

Als Versuchstiere werden Ratten oder Mäuse empfohlen. Gesunde, voll geschlechtsreife Tiere werden randomisiert und Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet.

### Anzahl und Geschlecht

Man sollte eine ausreichende Anzahl behandelter Männchen verwenden, um der spontanen Variation des auszuwertenden biologischen Merkmales Rechnung zu tragen. Die Entscheidung über die Anzahl sollte auf der vorher festgelegten Erkennungsgenauigkeit und gewünschten Signifikanz-Schranke beruhen. So sollte in einem typischen Versuch die Anzahl der Männchen in jeder Dosierungsgruppe ausreichen, um 30 bis 50 trächtige Weibchen pro Paarungsintervall zu erzielen.

### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Normalerweise sind für jeden Versuch gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen erforderlich. Stehen Ergebnisse von positiven Kontrollen zur Verfügung, die in letzter Zeit im selben Labor erhoben wurden, so können anstelle einer gleichzeitigen Positivkontrolle diese Ergebnisse verwendet werden.

Bekannte Mutagene sind als Positivkontrollen mit einer angemessenen niedrigeren Dosierung (z. B. MMS, i. p., mit 10 mg/kg) zum Nachweis der Testempfindlichkeit zu verwenden.

### Dosierung

Normalerweise sind drei verschiedene Dosierungen zu verwenden. Die hohe Dosierung sollte Toxizitätsanzeichen oder verringerte Fruchtbarkeit bei den behandelten Tieren hervorrufen. In bestimmten Fällen kann eine einmalige hohe Dosierung ausreichen.

### „Limit“-Test

Nichttoxische Substanzen sind mit 5 g/kg bei einmaliger Verabreichung oder mit 1g/kg pro Tage bei mehrmaliger Verabreichung zu testen.

### Versuchsdurchführung

Man kann nach verschiedenen Behandlungsplänen vorgehen. Am weitesten verbreitet ist die einmalige Verabreichung der Prüfsubstanz, doch kann man auch andere Behandlungspläne anwenden.

Einzelne Männchen werden in angemessenen Abständen der Behandlung mit einem oder zwei unbehandelten virginellen Weibchen verpaart. Die Weibchen und Männchen sollten mindestens während der Dauer eines Östruszyklus zusammenbleiben oder solange, bis die Paarung stattgefunden hat. Eine erfolgte Paarung wird durch Anwesenheit von Sperma in der Vagina oder anhand eines Vaginalpfropfes festgestellt.

Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem Behandlungsplan; sie muß ausreichen, um alle Keimzellenstadien nach der Behandlung zu erfassen.

Die Weibchen werden in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit getötet. Der Uterusinhalt wird zur Bestimmung der Anzahl toter und lebender Implantate untersucht. Eine Untersuchung der Ovarien zur Bestimmung der Anzahl der *Corpora lutea* ist möglich.

2.

### DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der Männchen, der Anzahl der trächtigen Weibchen und der Anzahl nicht trächtiger Weibchen darzustellen. Die Ergebnisse jeder Paarung einschließlich der Identität jedes Männchens und Weibchens sind einzeln durchzuführen. Für jedes Weibchen ist die Paarungswoche, die den Männchen verabreichte Dosis und die Häufigkeit der lebenden und der toten Implantate anzugeben. Die Berechnung des gesamten dominanten Letaleffekts beruht auf einem Vergleich der Anzahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Versuchsgruppe mit der Anzahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe. Eine Analyse des Verhältnisses von toten und lebenden Implantaten aus der behandelten Gruppe verglichen mit dem gleichen Verhältnis aus der Kontrollgruppe ergibt den Postimplantationsverlust.

Werden frühes oder spätes Absterben gesondert erfaßt, muß dies aus den Tabellen hervorgehen. Wird der Präimplantationsverlust berechnet, ist er anzugeben. Der Präimplantationsverlust kann als Differenz zwischen der Anzahl der *Corpora lutea* und der Anzahl der Implantate oder als Verringerung der Durchschnittszahl der Implantate pro Uterus gegenüber den Kontrollpaarungen berechnet werden.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit geeigneten statistischen Verfahren.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Art, Stamm, Alter und Gewicht der verwendeten Tiere, Anzahl der Männchen und Weibchen in Versuchs- und Kontrollgruppen;
- Prüfsubstanz, Lösungsmittel, getestete Dosierungen und Begründung für die Wahl der Dosierung, Negativ- und Positivkontrollen, Toxizitätsdaten;
- Behandlungsart und -dauer;
- Paarungsplan;
- Verfahren zur Feststellung, ob die Paarung erfolgt ist;
- Zeitpunkt der Tötung;
- Kriterien für die Erfassung der dominanten Letaleffekte;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## IN VIVO — SÄUGER-KEIMZELLZUTOGENETIK

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Mit diesem zytogenetischen *in-vivo*-Test werden strukturelle Chromosomenaberrationen in Spermatogonien ermittelt. Er umfaßt die Untersuchungen auf Chromatiden- und Chromosomentypaberrationen in Mitosen von Spermatogonien.

Verwendet werden Hodenpräparate von Säugetieren, die auf geeignetem Weg mit den Prüfsubstanzen behandelt und nach verschiedenen Zeitspannen getötet werden. Vor der Tötung werden die Tiere außerdem mit Spindelgiften wie Colchicin behandelt, um eine Akkumulation der Zellen in einem metaphasenähnlichen Stadium der Mitose (C-Metaphase) zu bewirken. Luftgetrocknete Chromosomenpräparate werden hergestellt, gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Die Untersuchung der Spermatozyten in der Diakinese-Metaphase I auf Translokationsmultivalente nach Behandlung der Spermatoconiostammzellen kann weitere nützliche Informationen liefern.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen werden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösemitteln gelöst oder suspendiert. Es sind frisch zubereitete Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanzen zu verwenden. Bedient man sich eines Lösungsmittels zur Erleichterung der Dosierung, darf dieses Lösungsmittel weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben.

*Verabreichungsweg*

Die Prüfsubstanz sollte im allgemeinen nur einmal verabreicht werden. Wenn toxikologische Gründe dafür sprechen, ist eine wiederholte Behandlung möglich, allerdings nur dann, wenn keine größeren zytotoxischen Auswirkungen der Prüfsubstanz auf differenzierende Spermatogonien zu beobachten sind.

Die Prüfsubstanz wird normalerweise per os oder intraperitoneal verabreicht. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

*Versuchstiere*

Am häufigsten werden Mäuse und Chinesische Hamster verwendet, doch kommen auch alle anderen Säugetierarten in Frage.

Gesunde, geschlechtsreife Männchen werden randomisiert und Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet.

#### Anzahl der Tiere

Es werden mindestens fünf Männchen pro Versuchs- und Kontrollgruppe verwendet.

#### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Für jeden Versuch sind gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen durchzuführen.

Bekannte Mutagene sind als Positivkontrollen mit einer angemessen niedrigeren Dosierung (z. B. MMS, i.p., mit 10 mg/kg) zum Nachweis der Testempfindlichkeit zu verwenden.

#### Dosierungen

Es wird nur eine Dosierung der Prüfsubstanz verwendet, entweder die höchste verträgliche Dosis oder diejenige Dosis, die gewisse Anzeichen einer zytotoxischen Wirkung hervorruft. Bewirkt diese Dosis einen hohen Anteil abgestorbener Zellen, sollte eine zusätzliche niedrigere zytotoxische Dosierung verwendet werden. Soll eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt werden, sind mindestens drei Dosierungen erforderlich (z. B. zur Bestätigung einer schwachen positiven Reaktion). Nichttoxische Substanzen sind, sowohl bei einmaliger als auch bei mehrmaliger Verabreichung mit der höchstmöglichen Dosis zu testen.

#### Versuchsdurchführung

Im allgemeinen werden die Tiere nur einmal mit der Prüfsubstanz behandelt. In der Gruppe mit der höchsten Dosis erfolgen nach der Behandlung drei Probenahmen in bestimmten Abständen. Die mittlere Probenahme erfolgt nach 24 Stunden. Da die Prüfsubstanz die Zellzykluskinetik beeinflussen kann, wird eine frühere und eine spätere Probenahme in angemessenen Abständen innerhalb des Zeitraums 6 bis 48 Stunden nach der Behandlung vorgenommen. Bei zusätzlichen Dosierungen sollte die Probenahme zu dem besonders empfindlichen Zeitpunkt oder, wenn dieser nicht bekannt ist, 24 Stunden nach der Behandlung erfolgen.

Alternativ dazu ist eine wiederholte Behandlung möglich. Die Tiere sind dann 24 Stunden nach der letzten Behandlung zu töten. Zusätzliche Probenahmen können innerhalb des Zeitraums 6 bis 24 Stunden nach der letzten Behandlung vorgenommen werden.

#### Präparation der Testes

Zur Untersuchung der Spermatogonienmitosen wird den Tieren eine ausreichende Dosis Spindelgift (z. B. Colchicin) intraperitoneal injiziert. Nach einem angemessenen Zeitraum werden die Tiere getötet. Bei Mäusen beträgt dieser Zeitraum 3 bis 5 Stunden, bei Chinesischen Hamstern können mehr als 5 Stunden erforderlich sein.

Es werden luftgetrocknete Präparate hergestellt. Bei einigen Arten sind u. U. Modifikationen des Standardverfahrens erforderlich. Zellsuspensionen werden hergestellt, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden auf Objektträger aufgetropft und gefärbt. Vor der mikroskopischen Untersuchung werden die Objektträger codiert.

#### Mikroskopische Analyse

Mindestens 100 gut gespreitete mitotische Metaphase mit der vollständigen Zentromeranzahl werden analysiert. Außerdem kann zur Ermittlung einer möglichen zytotoxischen Wirkung das Verhältnis der Spermatogonienmitosen zu den ersten und zweiten meiotischen Metaphasen in einer Probe von insgesamt 100 sich teilenden Zellen bestimmt werden.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Alle Aberrationstypen werden für Kontroll- und behandelten Tieren getrennt aufgeführt. Anzugeben sind auch die Gesamtzahl der untersuchten Zellen und die Gesamtzahl der aberranten Zellen pro Gruppe. Für alle Parameter werden Durchschnittswerte und Standardabweichung aufgeführt. Für jede Versuchs- und Kontrollgruppe ist das durchschnittliche Verhältnis der Spermatogonienmitosen zu den ersten und zweiten meiotischen Metaphasen anzugeben.

Die Daten sind unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren auszuwerten.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Art und Stamm der Männchen, Alter und Gewicht der Männchen;
- Anzahl der Tiere für jede Versuchs- und Kontrollgruppe;
- Versuchsbedingungen, genaue Behandlungsbeschreibung, Dosierung, Lösungsmittel, verwendetes Spindelgift;
- Anzahl der untersuchten Zellen pro Tier in jeder Gruppe;
- Für jedes behandelte und Kontrolltier sind Art und Anzahl der Aberrationen getrennt anzugeben;
- statistische Auswertung;
- Besprechung der Ergebnisse;
- Interpretation der Ergebnisse.

**3.2. Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**4. LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## IN VIVO-SÄUGER-FELLFLECKENTEST DER MAUS

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Es handelt sich um einen *in-vivo*-Test mit Mäusen, bei dem in der Entwicklung befindliche Embryonen in utero mit den Prüfsubstanzen behandelt werden. Die Zielzellen in diesen Embryonen sind die Melanoblasten, die Zielgene diejenigen Gene, die die Pigmentierung der Fellhaare steuern. Die in der Entwicklung befindlichen Embryonen sind heterozygot für eine Anzahl dieser Fellfarbgene. Eine Mutation oder der Verlust (ausgelöst durch verschiedene genetische Ereignisse) des dominanten Allels eines derartigen Gens in einem Melanoblasten führt zur Expression des rezessiven Phänotyps. Im Fell der aus dem Embryo entstandenen Maus ist an einer Stelle ein Fleck mit einer anderen Farbe zu sehen. Die Anzahl der Nachkommen mit andersfarbigen Flecken wird erfaßt. Ihre Häufigkeit wird mit der Häufigkeit beim Nachkommen aus der Lösungsmittelkontrolle verglichen. Mit dem „Mouse Spot Test“ lassen sich mutmaßliche somatische Mutationen in fetalen somatischen Zellen feststellen.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen sind möglichst in isotonischer Kochsalzlösung zu lösen oder zu suspendieren. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert. Das verwendete Lösungsmittel darf weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben. Es sind frische Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanz zu verwenden.

*Versuchstiere*

Mäuse des Teststammes T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye,  $c^{ch} p/c^{ch} p$ ; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) werden entweder mit dem Harwell Test-Stamm HT (pallid, nonagouti, brachypodi, pa a bp/pa a bp; leaden, fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) oder mit C57 BL (nonagouti, a/a) gepaart. Auch andere geeignete Kreuzungen, wie zwischen NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) und DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d), können verwendet werden, sofern die nonagouti-Nachkommen hervorbringen.

*Anzahl und Geschlecht*

Es sind so viele trächtige Weibchen zu behandeln, daß für jede verwendete Dosierung eine geeignete Anzahl Nachkommen geboren wird. Welche Stichprobengröße angemessen ist, hängt von der an den behandelten Mäusen beobachteten Fleckenrate und der Größe der Kontrolldaten ab. Ein negatives Ergebnis ist nur dann annehmbar, wenn mindestens 300 Nachkommen von Weibchen, die mit der höchsten Dosierung behandelt wurden, erfaßt worden sind.

*Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen*

Es sollten gleichzeitig erhobene Kontrolldaten von Mäusen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden (negative Kontrollen), verfügbar sein. Zur Erhöhung der Testempfindlichkeit können die Daten der in der Vergangenheit im selben Labor durchgeführten Kontrollen zusammengefaßt werden, sofern sie homogen sind.

Läßt sich eine Mutagenität der Prüfsubstanz nicht feststellen, sollten Positivkontrolldaten zur Verfügung stehen, die in letzter Zeit im selben Labor mit einer Substanz ermittelt wurden, deren Mutagenität sich nachweislich mit diesem Test feststellen läßt.

#### Verabreichungsweg

Normalerweise wird die Prüfsubstanz den trächtigen Weibchen per os oder intraperitoneal verabreicht. Ggf. erfolgt die Exposition durch Inhalation, oder es wird eine andere Verabreichung verwendet.

#### Dosierung

Es kommen mindestens zwei Dosierungen zur Anwendung, von denen eine Anzeichen von Toxizität hervorruft oder eine verringerte Wurfgröße bewirkt. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung mit der höchstmöglichen Dosierung erfolgen.

#### Versuchsdurchführung

Normalerweise erfolgt eine einmalige Behandlung an Tag 8, 9 oder 10 der Trächtigkeit, wobei als Tag 1 der Tag gewählt wird, an dem der Vaginalpfropf festgestellt wird. Diese Tage entsprechen 7,25, 8,25 und 9,25 Tagen nach Empfängnis. Es können sukzessive Behandlungen an diesen Tagen durchgeführt werden.

#### Analyse

Die Nachkommen werden kodiert und drei bis vier Wochen nach der Geburt auf Fellflecken untersucht. Man unterscheidet zwischen drei Kategorien von Flecken:

- a) weiße Flecken im Bereich von 5 mm um die mittlere Ventrallinie, die vermutlich auf das Abtöten von Zellen zurückzuführen sind (WMVS);
- b) gelbe, agouti-ähnliche Flecken in Mamma-, Genitalien-, vorderen Hals-, Axillar- und Inguinalbereich sowie auf der Mitte der Stirn, die vermutlich durch Fehldifferenzierung bedingt sind (MDS);
- c) über das gesamte Fell verteilt auftretende pigmentierte und weiße Flecken, die vermutlich auf somatische Mutationen zurückgehen (RS).

Alle drei Kategorien werden quantitativ erfaßt, doch ist nur die letzte, die Kategorie RS, von genetischer Relevanz. Probleme bei der Unterscheidung zwischen MDS und RS lassen sich durch Fluoreszenzmikroskopie von Haarproben lösen.

Deutliche makroskopische morphologische Abnormalitäten der Nachkommen sind zu vermerken.

## 2. DATEN

Anzugeben ist die Gesamtzahl der erfaßten Nachkommen und die Anzahl der Nachkommen, die einen oder mehrere, vermutlich durch somatische Mutationen bedingte Flecken aufweisen. Die Daten, bezogen auf die Wurfgröße, sollten ebenfalls angegeben werden. Die Behandlungs- und Negativkontrolldaten werden mit geeigneten statistischen Verfahren verglichen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- die zur Kreuzung verwendeten Stämme;
- Anzahl der trächtigen Weibchen in den Versuchs- und Kontrollgruppen;
- die durchschnittliche Wurfgröße in den Versuchs- und Kontrollgruppen bei der Geburt und beim Absetzen;
- Dosierung(en) der Prüfsubstanz;
- verwendetes Lösungsmittel;

- 
- Tag der Trächtigkeit, an dem die Behandlung durchgeführt wurde;
  - Verabreichungsweg;
  - Gesamtzahl der erfaßten Nachkommen und Anzahl der Nachkommen mit MWVS, MDS und RS in den Versuchs- und Kontrollgruppen;
  - makroskopische morphologische Abnormitäten;
  - ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung für RS;
  - statistische Auswertung;
  - Diskussion der Ergebnisse;
  - Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## IN VIVO-SÄUGER-TRANSLOKATIONSTEST

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

## 1.4. Prinzip der Methode

Mit dem Translokationstest der Maus lassen sich strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen, die in Säugetier-Keimzellen auftreten, unter Nachkommen der ersten Generation ermitteln. Bei den beobachteten Chromosomenveränderungen handelt es sich um reziproke Translokationen und — bei weiblichen Nachkommen — um X-Chromosomenverlust. Träger von Translokationen und XO-Weibchen weisen eine verringerte Fertilität auf, die man zur Auswahl von F<sub>1</sub>-Nachkommen für die zytogenetische Analyse nutzt. Bestimmte Translokationstypen (X-Autosomentranslokation und Zentromer/Telomer-Translokation) verursachen vollständige Sterilität. Translokationen werden zytogenetisch in meiotischen Zellen in der Diakinese-Metaphase I männlicher Tiere (entweder F<sub>1</sub>-Männchen oder Söhne von F<sub>1</sub>-Weibchen) beobachtet. Die XO-Weibchen lassen sich zytogenetisch aufgrund der Anwesenheit von 39 statt 40 Chromosomen in Knochenmarksmitosen identifizieren.

## 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

## 1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanz wird in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert.

Es sind frisch zubereitete Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanzen zu verwenden. Wird zur Erleichterung der Dosierung ein Lösungsmittel verwendet, darf dieses weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben.

*Verabreichungsweg*

Die Prüfsubstanz wird normalerweise per os oder intraperitoneal verabreicht. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

*Versuchstiere*

Die Versuche werden an Mäusen durchgeführt, da deren Zucht und zytologische Untersuchung relativ einfach sind. Ein bestimmter Stamm ist nicht vorgeschrieben. Bei Anwendung der Fertilitätsuntersuchung sollte jedoch die durchschnittliche Wurfgröße des verwendeten Stammes mehr als acht Junge betragen und relativ konstant sein. Es werden gesunde, geschlechtsreife Tiere verwendet.

*Anzahl der Tiere*

Die erforderliche Anzahl der Versuchstiere hängt von der spontanen Translokationshäufigkeit und der für ein positives Ergebnis erforderlichen Erhöhung der Translokationshäufigkeit ab.

Normalerweise umfaßt der Test die Untersuchung der männlichen F<sub>1</sub>-Nachkommen. Pro Dosierungsgruppe sind mindestens 500 männliche F<sub>1</sub>-Nachkommen zu testen. Werden auch weibliche F<sub>1</sub>-Nachkommen berücksichtigt, sind 300 Männchen und 300 Weibchen erforderlich.

### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Geeignete Daten gleichzeitig durchgeführter und historischer Kontrollen sollten vorliegen. Stehen Ergebnisse von Positivkontrollen zur Verfügung, die in letzter Zeit im selben Labor erhoben wurden, so können diese Ergebnisse anstelle einer gleichzeitigen Positivkontrolle verwendet werden.

### Dosierung

Getestet wird eine Dosierung. Dabei handelt es sich normalerweise um die höchste Dosis, die eine minimale toxische Wirkung ausübt, ohne jedoch das reproduktive Verhalten oder die Überlebensrate der behandelten Tiere zu beeinträchtigen. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung sind zwei zusätzliche niedrigere Dosierungen erforderlich. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung mit der höchstmöglichen Dosierung erfolgen.

### Versuchsdurchführung

#### Behandlung und Paarung

Es stehen zwei Behandlungspläne zur Verfügung. Am häufigsten wird die einmalige Verabreichung der Prüfsubstanz gewählt. Auch die Verabreichung an 7 Tagen/Woche während 35 Tagen ist möglich. Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem gewählten Behandlungsplan; es ist sicherzustellen, daß alle behandelten Keimzellstadien erfaßt werden. Nach dem Ende der Paarungsperiode werden die Weibchen einzeln in Käfigen untergebracht. Für jeden Wurf werden Geburtsdatum, Wurfgröße und Geschlecht der Jungen aufgezeichnet. Alle männlichen Jungen werden abgesetzt, alle weiblichen Jungen ausgesondert, sofern sie nicht in dem Versuch verwendet werden.

### Untersuchung auf Translokationsheterozygotie

Es stehen zwei Verfahren zur Auswahl:

- Fertilitätsuntersuchung der F<sub>1</sub>-Nachkommen und anschließende Ermittlung möglicher Translokationsträger durch zytogenetische Analyse
- zytogenetische Analyse aller männlichen F<sub>1</sub>-Nachkommen ohne vorherige Auswahl der Fertilitätsuntersuchung.

#### a) Fertilitätsuntersuchung

Die verringerte Fertilität eines F<sub>1</sub>-Tieres läßt sich durch Beobachtung der Wurfgröße bzw. Analyse des Uterusinhalts des mit diesem Tier gepaarten Weibchens feststellen.

Die Kriterien für die Bestimmung der normalen und reduzierten Fertilität sind jeweils für den verwendeten Mäusestamm festzulegen.

*Beobachtung der Wurfgröße:* Die zu untersuchenden F<sub>1</sub>-Männchen werden einzeln mit Weibchen aus dem gleichen Versuch oder aus der Kolonie gepaart. Die Käfige werden ab dem 18. Tag nach der Paarung täglich inspiziert. Wurfgröße und Geschlecht der F<sub>2</sub>-Nachkommen werden bei der Geburt aufgezeichnet; die Würfe werden danach ausgesondert. Bei der Untersuchung weiblicher F<sub>1</sub>-Nachkommen behält man die F<sub>2</sub>-Nachkommen kleiner Würfe zur weiteren Untersuchung. Weibliche Translokationsträger werden durch zytogenetischen Nachweis einer Translokation in wenigstens einem ihrer männlichen Nachkommen identifiziert. XO-Weibchen erkennt man daran, daß sich bei ihren Nachkommen das Geschlechtsverhältnis von 1:1 zu 1:2 (Männchen:Weibchen) ändert. Bei einem sequentiellen Verfahren werden normale F<sub>1</sub>-Tiere nicht weiter untersucht, wenn der erste F<sub>2</sub>-Wurf einen vorher festgelegten Normalwert erreicht oder überschreitet. Anderenfalls wird ein zweiter oder dritter F<sub>2</sub>-Wurf untersucht. F<sub>1</sub>-Tiere, die nach Inspektion von bis zu drei F<sub>2</sub>-Würfen nicht als normal eingestuft werden können, werden entweder durch Analyse des Uterusinhaltes der mit ihnen gepaarten Weibchen weiter untersucht oder direkt einer zytogenetischen Analyse unterzogen.

*Analyse des Uterusinhalts:* Die Verringerung der Wurfgröße bei Translokationsträgern ist auf das Absterben von Embryonen zurückzuführen. Eine hohe Anzahl toter Implantate weist also auf eine Translokation in dem Versuchstier hin. Die zu untersuchenden F<sub>1</sub>-Männchen werden jeweils mit zwei oder drei Weibchen gepaart. Ob eine Empfängnis stattgefunden hat, wird durch tägliche Untersuchung auf Vaginalpfropf zwischen 8 und 10 Uhr morgens festgestellt. 14 bis 16 Tage danach werden die Weibchen getötet; die Anzahl der lebenden und toten Implantate in ihren Uteri wird aufgezeichnet.

#### b) Zytogenetische Analyse

Es werden luftgetrocknete Hodenpräparate hergestellt. Translokationsträger lassen sich durch das Vorhandensein von Multivalentkonfigurationen in der Diakinese-Metaphase I in primären Spermatozyten identifizieren. Werden mindestens zwei Zellen mit Translokationsmultivalenten beobachtet, ist damit der erforderliche Nachweis erbracht, daß es sich bei dem untersuchten Tier um einen Translokationsträger handelt.

Erfolgt keine Zuchtauswahl, werden  $F_1$ -Männchen zytogenetisch untersucht. Mindestens 25 Diakinese-Metaphasen I pro Männchen sind mikroskopisch auszuwerten. Bei  $F_1$ -Männchen mit kleinen Hoden und Zusammenbruch der Meiose vor der Diakinese oder bei  $F_1$ -Weibchen, bei denen XO-Verdacht besteht, ist eine Untersuchung der mitotischen Metaphasen in Spermatogonien oder im Knochenmark erforderlich. Das Vorhandensein eines ungewöhnlich langen und/oder kurzen Chromosoms in jeder von 10 Zellen beweist, daß eine bestimmte, für Männchen steril wirkende Translokation (Typ c/t) vorliegt. Einige X-Autosomentranslokationen, die männliche Sterilität verursachen, lassen sich nur durch Bandenanalyse mitotischer Chromosomen ermitteln. Das Vorhandensein von 39 Chromosomen in jeder von 10 Mitosen ist ein Beweis dafür, daß es sich um ein XO-Weibchen handelt.

## 2. DATEN

Die Daten werden in tabellarischer Form dargestellt.

Für jeden Paarungsabschnitt sind die durchschnittliche Wurfgröße und das Geschlechtsverhältnis bei der Geburt und beim Absetzen anzugeben. Die Angaben der Fertilitätsuntersuchung von  $F_1$ -Tieren müssen die durchschnittliche Wurfgröße aus allen normalen Paarungen und die jeweiligen Wurfgrößen bei  $F_1$ -Translokationsträgern umfassen. Zur Analyse des Uterinhalts sind die durchschnittliche Anzahl der lebenden und toten Implantate aus normalen Paarungen und die Anzahl der lebenden und toten Implantate aus jeder Paarung von  $F_1$ -Translokationsträgern anzugeben.

Die Angaben zur zytogenetischen Analyse der Diakinese-Metaphase I sollten für jeden Translokationsträger die Anzahl der Multivalentkonfigurationstypen sowie die Gesamtzahl der Zellen umfassen.

Für sterile  $F_1$ -Tiere sind die Gesamtzahl der Paarungen und die Dauer der Paarungsperiode anzugeben, ebenso die Hodengewichte und nähere Einzelheiten über die zytogenetische Analyse.

Für XO-Weibchen sind die durchschnittliche Wurfgröße, das Geschlechtsverhältnis unter den  $F_2$ -Nachkommen und die Ergebnisse der zytogenetischen Analyse aufzuführen.

Erfolgt eine Vorauswahl möglicher  $F_1$ -Translokationsträger aufgrund von Fertilitätsuntersuchungen, müssen die Tabellen auch Angaben darüber enthalten, bei wievielen dieser Tiere die Translokationsheterozygotie bestätigt wurde.

Auch die Daten aus Negativkontrollen und die Positivkontrollversuche sind anzuführen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Mäusestamm, Alter der Tiere, Gewicht der behandelten Tiere;
- Anzahl der Elterntiere beiderlei Geschlechts in Versuchs- und Kontrollgruppen;
- Prüfbedingungen, genaue Beschreibung der Behandlung, Dosierungen, Lösungsmittel, Paarungsplan;
- Anzahl und Geschlecht der Jungen pro Weibchen, Anzahl und Geschlecht der zur Translokationsanalyse aufgezogenen Jungen;
- Zeitpunkt der und Kriterien für die Translokationsanalyse;
- Anzahl und eingehende Beschreibung der Translokationsträger einschließlich Zuchtdateien und ggf. Daten über den Uterusinhalt;
- Zytogenetische Verfahren und nähere Angaben über die mikroskopische Analyse, möglichst mit Abbildungen;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einhaltung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**TEIL C: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ÖKOTOXIZITÄT****ALLGEMEINE EINLEITUNG: TEIL C**

Die nachstehend beschriebenen Prüfmethode dienen dem Nachweis einiger der in Anhang VIII der Richtlinie 79/831/EWG angegebenen ökotoxischen Eigenschaften. Die Anmelder sollten sich im klaren darüber sein, daß dieser Text keine Methoden zum Nachweis der folgenden Eigenschaften unter Stufe 1 von Anhang VIII umfaßt:

- längerdauernde Toxizitätsuntersuchungen mit *Daphnia magna*;
- Prüfungen an höheren Pflanzen;
- längerdauernde Toxizitätsuntersuchungen an Fischen;
- Akkumulationsprüfungen mit bestimmten Arten.

Methoden zum Nachweis dieser Eigenschaften werden nach ihrer endgültigen Abfassung in der Form einer weiteren Anpassung an den technischen Fortschritt veröffentlicht. Bis dahin sollten die Anmelder international anerkannte Methoden anwenden, die der zuständigen Behörde anzugeben sind.

**ALGEN: PRÜFUNG DER WACHSTUMSHEMMUNG****1. METHODE****1.1. Einleitung**

Zweck dieser Prüfung ist es, die Wirkung einer Substanz auf das Wachstum einer einzelligen Grünalgenart zu bestimmen. In verhältnismäßig kurzer Zeit kann die Wirkung über mehrere Generationen hinweg bewertet werden. Nach der hier vorliegenden Methode können mehrere einzellige Algenarten untersucht werden; der Prüfbericht muß die Beschreibung der verwendeten Methode enthalten.

Diese Methode läßt sich am leichtesten für solche wasserlöslichen Substanzen anwenden, die unter den Versuchsbedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit im Wasser verbleiben.

Für Substanzen, die im Prüfmedium begrenzt löslich sind, läßt sich der  $EC_{50}$ -Wert möglicherweise nicht quantitativ bestimmen (siehe unter Definitionen).

Die Methode kann angewandt werden, wenn die Substanzen nicht direkt mit der Messung des Algenwachstums interferieren.

Folgende Informationen sind bei der Durchführung dieser Prüfung nützlich:

- Löslichkeit in Wasser;
- Dampfdruck;
- Strukturformeln;
- Reinheit der Substanz;
- chemische Wasser- und Lichtstabilität;
- Methoden zur quantitativen Bestimmung der Substanz in Wasser;
- $pK_a$ -Wert;
- n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient;
- Ergebnisse eines Tests auf leichte biologische Abbaubarkeit.

**1.2. Definitionen und Einheiten**

Die Zellkonzentration ist die Anzahl der Zellen pro ml.

Das Wachstum ist der Anstieg der Zellkonzentration während der Versuchszeit.

Die Wachstumsrate ist der Anstieg der Zellkonzentration pro Zeiteinheit.

Die  $EC_{50}$  ist gemäß dieser Methode die Konzentration der Prüfsubstanz, die das Wachstum oder die Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle um 50 % verringert.

NOEC (no observed effect concentration = Konzentration, bei der keine Wirkung beobachtet wird) ist gemäß dieser Methode die höchste geprüfte Konzentration, bei der der (die) gemessene(n) Parameter keine signifikante Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zeigt (zeigen).

**1.3. Referenzsubstanz**

Eine Referenzsubstanz kann geprüft werden, um unzureichende Versuchsbedingungen anzuzeigen. Wird eine Referenzsubstanz eingesetzt, so müssen die Ergebnisse im Prüfbericht enthalten sein. Kaliumdichromat ist als Referenzsubstanz geeignet.

**1.4. Prinzip der Methode**

Exponentiell wachsende Kulturen ausgewählter Grünalgen werden verschiedenen Konzentrationen der Prüfsubstanz über mehrere Generationen unter definierten Bedingungen ausgesetzt. Die Wachstumshemmung, bezogen auf eine Kontrollkultur, wird über einen festgelegten Zeitraum bestimmt.

## 1.5. Qualitätskriterien

## 1.5.1 Bedingungen für die Gültigkeit des Tests

In den Kontrollkulturen muß die Zellkonzentration innerhalb von 3 Tagen mindestens um mehr als den Faktor 16 angestiegen sein.

Ein Verschwinden der Prüfschubstanz aus dem Wasser in die Biomasse macht die Prüfung nicht notwendigerweise ungültig.

## 1.6. Beschreibung des Prüfverfahrens

## 1.6.1. Vorbereitung

## 1.6.1.1. Geräte und Material

- Normale Laborausstattung,
- Prüfkolben von geeignetem Volumen (z. B. 250 ml Erlenmeyerkolben für 100 ml Prüflösung)
- Aufzuchtapparat: Klimaraum oder Klimakammer mit 21 bis 25 °C ± 2 °C und einheitlichem Dauerlicht im Spektralbereich von 400 bis 700 nm.
- (Es wird ein Quantenfluß von  $0,72 \times 10^{20}$  Photonen/m<sup>2</sup>s ± 20 % empfohlen. Dieser Quantenfluß ist gleich 120 µE/m<sup>2</sup>s und wird erzielt mit fluoreszierenden Lampen vom Typ Universalweiß (Licht-Temperatur 4 200 K), die etwa 8 000 Lux ergeben, gemessen mit einem Kugelkollektor).
- Geräte zur Bestimmung der Zellkonzentrationen, z. B. elektronischer Partikelzähler, Mikroskop mit Zählkammer, Geräte zur fluorimetrischen, spektrophotometrischen, kolorimetrischen Messung (Anmerkung: um bei niedrigen Zellkonzentrationen bei einer spektrophotometrischen Bestimmung zu brauchbaren Messungen zu kommen, sind gegebenenfalls Küvetten mit einer Schichtdicke von mindestens 4 cm erforderlich).

## 1.6.1.2. Algenkulturmedium

Das folgende Medium wird empfohlen:

NH <sub>4</sub> Cl:	15	mg/l,
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:	12	mg/l,
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O:	18	mg/l,
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O:	15	mg/l,
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	1,6	mg/l,
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O:	0,08	mg/l,
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O:	0,1	mg/l,
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	0,185	mg/l,
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O:	0,415	mg/l,
ZnCl <sub>2</sub> :	$3 \times 10^{-3}$	mg/l,
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l,
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O:	$10^{-5}$	mg/l,
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O:	$7 \times 10^{-3}$	mg/l,
NaHCO <sub>3</sub> :	50	mg/l.

Nach Belüftung hat dieses Medium einen pH-Wert von etwa 8.

Neben dem genannten können auch andere Medien eingesetzt werden, vorausgesetzt, daß bei den wesentlichen Bestandteilen folgende Grenzen beachtet werden:

P:	≤ 0,7 mg/l,
N:	≤ 10 mg/l,
Chelatbildner:	≤ 10 <sup>-3</sup> mmol/l,
Wasserhärte(Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/l.

Das empfohlene Medium sowie das in der Literaturangabe <sup>(1)</sup> angegebene entsprechen dieser Anforderung.

## 1.6.1.3. Prüforganismen

## Auswahl der Art

Die Grünalgenart muß schnell wachsend und für Aufzucht und Prüfung leicht handhabbar sein. Folgende Arten werden für geeignet gehalten:

- *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,
- *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,
- *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Falls andere Arten eingesetzt werden, muß der verwendete Stamm angegeben werden.

#### 1.6.1.4. Versuchsanordnung

##### Ausgangszellkonzentration

Die Ausgangszellkonzentration in den Prüfkulturen sollte für *Selenastrum capricornutum* und *Scenedesmus subspicatus* bei etwa  $10^4$  Zellen pro ml liegen. Wenn andere Arten verwendet werden, muß die Biomasse vergleichbar sein.

##### Konzentrationen der Prüfsubstanz

Der Konzentrationsbereich, in dem mit Wirkungen zu rechnen ist, wird auf der Grundlage der Ergebnisse aus Vorversuchen bestimmt. Für die Prüfung werden mindestens 5 Konzentrationen in geometrischer Reihe gewählt. Die niedrigste geprüfte Konzentration sollte keine beobachtbare Wirkung auf das Algenwachstum zeigen. Die höchste geprüfte Konzentration sollte das Wachstum zu mindestens 50 % (bezogen auf die Kontrolle) hemmen, möglichst vollständig unterbinden.

##### Mehrfachproben und Kontrollen

Die Versuchsanordnung sollte möglichst 3 Ansätze zu jeder Prüfkonzentration und im Idealfall die doppelte Anzahl an Kontrollen vorsehen. Im besonderen Fall kann die Versuchsanordnung verändert werden, indem die Zahl der Prüfkonzentrationen erhöht und die der Parallelansätze pro Konzentration verringert wird.

Wenn die Prüfsubstanz in einem Trägerstoff gelöst werden muß, sind zusätzliche Kontrollen anzusetzen, die den Trägerstoff in der höchsten, bei den Prüfkulturen eingesetzten Konzentration enthalten.

#### 1.6.2. Durchführung der Prüfung

Dieser Abschnitt enthält die Prüfanleitung für leicht lösliche, schwer lösliche und flüchtige Substanzen.

##### 1.6.2.1. Prüfung leicht wasserlöslicher Substanzen

Die Prüfkulturen mit den gewünschten Konzentrationen der Prüfsubstanz und der gewünschten Menge an Algen werden hergestellt, indem aliquote Teile der Stammlösungen der Prüfsubstanz und der Algensuspension mit filtriertem Algenkulturmedium verdünnt werden.

Die Kulturkolben werden geschüttelt und in den Aufzuchtapparat gestellt. Während der Prüfung müssen die Algen in Suspensionen gehalten werden, damit der  $\text{CO}_2$ -Austausch gewährleistet ist. Zu diesem Zweck kann geschüttelt, gerührt oder belüftet werden. Die Kulturen werden bei 21 bis 25 °C mit einer Abweichung von nicht mehr als  $\pm 2$  °C gehalten.

Die Zellkonzentration wird in jedem Kolben mindestens 24, 48 und 72 Stunden nach Prüfbeginn bestimmt. Filtriertes Algenkulturmedium dient bei Verwendung von Partikelzählern zur Hintergrundbestimmung und bei Verwendung von Spektrophotometern als Blindprobe.

Der pH-Wert wird zu Beginn der Prüfung und nach 72 Stunden gemessen. Er sollte sich während der Prüfung nicht um mehr als 1 Einheit verändern.

##### 1.6.2.2. Prüfung von begrenzt wasserlöslichen Substanzen

Wenn die Löslichkeit der Prüfsubstanz in der Größenordnung der höchsten in der Prüfung eingesetzten Konzentration liegt, ist nur ein geringfügig verändertes Verfahren nötig, um die Prüflösungen anzusetzen. Die Stammlösung der Prüfsubstanz kann eine gesättigte Lösung sein, oder aber es kann die Prüfsubstanz in der gewünschten Konzentration vor der Zugabe der Algensuspension im Algenkulturmedium gelöst werden.

Stammlösungen von wenig wasserlöslichen Substanzen können durch mechanische Dispersion hergestellt werden oder mit Hilfe von solchen Trägerstoffen, die für Algen wenig toxisch sind, wie organische Lösemittel, Emulgatoren oder Dispergiermittel. Die Konzentration an Trägerstoffen sollte 100 mg/l nicht überschreiten. In der Versuchsanordnung müssen zusätzliche Kontrollen, in denen der Trägerstoff in der höchsten, in der Prüflösung vorliegenden Konzentration vorhanden ist, enthalten sein.

##### 1.6.2.3. Prüfung von flüchtigen Substanzen

Bis heute gibt es noch keine allgemein gültige Methode, flüchtige Substanzen zu prüfen. Wenn man weiß, daß eine Substanz die Tendenz hat zu verdampfen, können geschlossene Prüfkolben mit vergrößertem Luftraum oberhalb der Flüssigkeit verwendet werden. Hierzu sind Methoden in verschiedenen Variationen vorgeschlagen worden (siehe Literaturangabe (1)). Es sollte versucht werden, den in den Lösungen verbleibenden Anteil der Substanz zu bestimmen. Die Ergebnisse einer Prüfung von flüchtigen Stoffen in geschlossenen Systemen sind mit äußerster Vorsicht zu interpretieren.

## 2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die in den Prüfkulturen und in den Kontrollen gemessenen Zellkonzentrationen werden mit den Konzentrationen der Prüfsubstanz und den Beobachtungszeitpunkten tabellarisch zusammengefaßt. Der Mittelwert der Zellkonzentration bei jeder Konzentration der Prüfsubstanz und bei den Kontrollen wird gegen die Zeit aufgetragen. Es ergeben sich daraus die Wachstumskurven.

Die Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung soll nach den folgenden beiden Verfahren bestimmt werden.

### 2.1. Vergleich der Flächen unter den Wachstumskurven

Die Fläche unter den Wachstumskurven läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

Dabei sind:

- A = Fläche,
- $N_0$  = Nominale Anzahl der Zellen/ml zum Zeitpunkt  $t_0$ ,
- $N_1$  = Gemessene Anzahl der Zellen/ml zum Zeitpunkt  $t_1$ ,
- $N_n$  = Gemessene Anzahl der Zellen/ml zum Zeitpunkt  $t_n$ ,
- $t_1$  = Zeitpunkt der ersten Messung nach Prüfungsbeginn,
- $t_n$  = Zeitpunkt der n-ten Messung nach Prüfungsbeginn.

Die Hemmung des Zellwachstums in % ( $I_A$ ) bei jeder Konzentration der Prüfsubstanz ist die Differenz zwischen der Fläche unter der Kontrollwachstumskurve ( $A_c$ ) und der Fläche unter der Wachstumskurve bei jeder Konzentration der Prüfsubstanz ( $A_t$ ), und zwar

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Die  $I_A$ -Werte werden auf halblogarithmischem Papier oder auf halblogarithmischem Wahrscheinlichkeitspapier gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Wenn die Punkte auf Wahrscheinlichkeitspapier aufgetragen sind, werden sie nach Augenmaß durch eine Gerade verbunden; wenn eine log-normale-Verteilung der Werte angenommen werden kann, kann eine berechnete Regressionskurve gezeichnet werden. Der  $EC_{50}$ -Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Regressionskurve und der Parallele zur Abszisse bei  $I_A = 50\%$ . Um diesen Wert eindeutig in Relation zu dieser Berechnungsmethode zu setzen, wird vorgeschlagen, das Symbol  $E_bC_{50}$  zu verwenden. Entsprechend der vorliegenden Methode, die die Messung nach 24, 48 und 72 Stunden vorsieht, wird das Symbol  $E_bC_{50}$  (0–72 h) benutzt.

Wenn  $I_A$  gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen wird, können auch andere EC-Werte abgelesen werden, wie z. B.  $E_bC_{10}$ .

### 2.2. Vergleich der Wachstumsraten

Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate ( $\mu$ ) von exponentiell wachsenden Kulturen kann berechnet werden nach

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate kann auch von der Steigung der Kurve abgeleitet werden, wenn  $\ln N$  gegen die Zeit aufgetragen wird.

Die im Vergleich zum Kontrollwert verminderte durchschnittliche Wachstumsrate in % bei jeder Konzentration der Prüfsubstanz wird gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. An der daraus resultierenden graphischen Darstellung können die  $EC_{50}$ -Werte abgelesen werden. Um den mit dieser Methode ermittelten  $EC_{50}$ -Wert eindeutig zu bezeichnen, wird vorgeschlagen, das Symbol  $E_rC_{50}$  einzusetzen. Die Beobachtungszeitpunkte müssen angegeben werden; wenn sich der Wert z. B. auf Beobachtungszeitpunkte von 24 und 48 Stunden bezieht, so wird das Symbol  $E_rC_{50}$  (24–48 h) benutzt.

*Anmerkung:* Die Wachstumsrate ist eine logarithmische Bezeichnung und kleine Änderungen der Wachstumsrate können große Änderungen der Biomasse bedeuten.  $E_bC$ - und  $E_rC$ -Werte sind daher numerisch nicht vergleichbar.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Prüfsubstanz: Chemische Daten;
- Prüforganismen: Herkunft, Laborkultur, Stammnummer, Anzuchtmethode;
- Prüfbedingungen:
  - Datum des Prüfbeginns und Prüfendes und Prüfdauer,
  - Temperatur,

- Zusammensetzung des Mediums,
- Aufzuchtapparat,
- pH-Wert der Lösungen zu Beginn und am Ende des Tests (wenn sich der pH-Wert um mehr als 1 Einheit verschiebt, müssen die Gründe dafür angegeben werden),
- Trägerstoff und Methode zur Lösung der Prüfsubstanz; Konzentration des Trägerstoffs in den Prüflösungen,
- Lichtintensität und Qualität,
- geprüfte Konzentrationen (gemessen oder nominal);
- Ergebnisse:
  - Zellkonzentration in jedem Kolben zu jedem Meßpunkt; Meßmethode zur Ermittlung der Zellkonzentration,
  - Mittelwerte der Zellkonzentration,
  - Wachstumskurven,
  - Graphische Darstellung der Konzentration-Wirkung-Beziehung,
  - EC-Werte und Berechnungsmethode,
  - NOEC,
  - andere beobachtete Wirkungen.

#### 4. LITERATURANGABEN

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 201*, Beschluß des Rates C(81)30 final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Anlage***BEISPIEL EINES VERFAHRENS FÜR ALGENKULTUREN****Allgemeines**

Auf der Grundlage des folgenden Verfahrens sollen Algenkulturen für Toxizitätsprüfungen gewonnen werden.

Die zu diesem Zweck eingesetzten Methoden müssen gewährleisten, daß die Algenkulturen nicht mit Bakterien infiziert sind (ISO 4833). Axenische Kulturen können unter Umständen wünschenswert sein, aber wesentlich ist es, daß die Kulturen nur eine Algenart enthalten.

Um eine Kontaminierung mit Bakterien und anderen Algen zu vermeiden, werden alle Arbeitsgänge unter weitgehend sterilen Bedingungen ausgeführt.

**Geräte und Material**

Siehe unter 1.6.1: Vorbereitung und Prüforganismen.

**Verfahren für Algenkulturen***Nährlösungen (Medien)*

Alle Nährsalze des Mediums werden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und dunkel und kühl aufbewahrt. Diese Lösungen werden über Membranfilter oder im Autoklaven sterilisiert.

Das Medium wird hergestellt, indem die genaue Menge an Stammlösung in steriles destilliertes Wasser gegeben wird; dabei ist darauf zu achten, daß keine Infektionen auftreten. Bei festen Medien werden 0,8% Agar hinzugefügt.

*Stammkultur*

Stammkulturen sind kleine Algenkulturen, die regelmäßig in frisches Medium übertragen werden. Sie dienen als Ausgangsprüfmateriale. Wenn die Kulturen nicht regelmäßig gebraucht werden, werden sie auf schrägen Agarröhrchen ausgestrichen. Diese werden mindestens alle 2 Monate in frisches Medium übertragen.

Die Stammkulturen wachsen in Erlenmeyerkolben mit etwa 100 ml des geeigneten Mediums. Wenn die Algen bei 20 °C und Dauerlicht inkubiert werden, müssen sie wöchentlich übertragen werden.

Mit sterilen Pipetten wird eine bestimmte Menge der „alten“ Kultur in frisches Medium übertragen, so daß die Ausgangskonzentration bei einer schnell wachsenden Art etwa  $\frac{1}{100}$  der Konzentration in der alten Kultur beträgt.

Die Wachstumsrate einer Art kann an der Wachstumskurve abgelesen werden. An dieser Wachstumskurve kann die Dichte abgeschätzt werden, bei der die Kultur in frisches Medium übertragen werden muß. Dies muß vor der Absterbephase der Kultur geschehen.

*Vorkultur*

Die Vorkultur soll die Algenmenge liefern, die für die Beimpfung der Prüfkulturen geeignet ist. Die Vorkultur wird unter Prüfbedingungen inkubiert und noch während des exponentiellen Wachstums eingesetzt, d. h. normalerweise nach einer Inkubationszeit von etwa 3 Tagen. Wenn die Algenkulturen deformierte oder abnorme Zellen enthalten, müssen sie verworfen werden.

## TOXIZITÄT FÜR REGENWÜRMER

## PRÜFUNG IN KÜNSTLICHEM BODEN

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Bei dieser Laborprüfung wird die Prüfsubstanz einem künstlichen Boden zugesetzt; in diesem Boden werden die Würmer 14 Tage lang gehalten. Nach 14 Tagen (wahlweise nach 7 Tagen) wird die tödliche Wirkung der Substanz auf die Regenwürmer überprüft. Dieser Test ist eine Methode zur relativ schnellen Überprüfung der Wirkung von Chemikalien auf Regenwürmer bei Aufnahme über die Haut und die Nahrung.

## 1.2. Definition und Meßgröße

LC<sub>50</sub>: Die Konzentration einer Substanz, durch die 50 % der Versuchstiere während der Versuchszeit getötet werden.

## 1.3. Referenzsubstanz

Mit einer Referenzsubstanz wird regelmäßig überprüft, daß sich die Empfindlichkeit des Prüfsystems nicht wesentlich geändert hat. Als Referenzsubstanz wird Chloracetamid p. a. empfohlen.

## 1.4. Prinzip der Prüfmethode

Der Boden ist ein sehr variables Medium; daher wird bei dieser Prüfung ein sorgfältig definierter künstlicher Lehmboden verwendet. Adulte Regenwürmer der Art *Eisenia foetida* (siehe Anmerkung in der Anlage) werden in einem definierten künstlichen Boden gehalten, der mit verschiedenen Konzentrationen der Prüfsubstanz behandelt wird. 14 Tage (wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn wird der Gefäßinhalt in einer flachen Schale ausgebreitet. Die bei der jeweiligen Konzentration überlebenden Regenwürmer werden gezählt.

## 1.5. Qualitätskriterien

Die Prüfmethode muß hinsichtlich Prüfsubstanz und Prüforganismus so reproduzierbar wie möglich sein. Die Mortalität in den Kontrollen darf am Ende der Prüfung 10 % nicht überschreiten oder aber die Prüfung ist ungültig.

## 1.6. Beschreibung des Prüfverfahrens

## 1.6.1. Material

## 1.6.1.1. Prüfsubstrat

Ein definierter künstlicher Boden wird als Grundprüfsubstrat eingesetzt.

## a) Grundsubstrat (in Prozent des Trockengewichts)

- 10 % Sphagnumtorf (so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; ohne sichtbare Pflanzenreste und fein gemahlen).
- 20 % Kaolinitkreide mit vorzugsweise mehr als 50 % Kaolinit.
- Etwa 69 % Industriequarzsand (überwiegend feiner Sand mit mehr als 50 % 0,05 bis 0,2 mm großen Teilchen). Wenn die Prüfsubstanz in Wasser ungenügend dispergierbar ist, werden 10 g pro Prüfgefäß aufbewahrt, die später mit der Prüfsubstanz gemischt werden.
- Etwa 1 % Kalziumcarbonat (CaCO<sub>3</sub>), in Pulverform, chemisch rein, zur Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 ± 0,5.

## b) Prüfsubstrat

Das Prüfsubstrat enthält das Grundsubstrat, die Prüfsubstanz und deionisiertes Wasser. Der Wassergehalt beträgt etwa 25 bis 42 % des Trockengewichts des Grundsubstrats. Der Wassergehalt des Substrats wird bestimmt, indem eine Probe bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird. Es ist eine wichtige Voraussetzung, daß der künstliche Boden durchnäßt ist, aber kein Wasser darauf steht. Um eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz im Substrat zu erzielen, muß sorgfältig gemischt werden. Es muß im Prüfbericht angegeben werden, wie die Prüfsubstanz in das Substrat eingebracht wird.

## c) Kontrollsubstrat

Das Kontrollsubstrat enthält das Grundsubstrat und Wasser. Wird ein Trägerstoff verwendet, so muß eine zusätzliche Kontrolle die gleiche Menge an Trägerstoff enthalten.

**1.6.1.2. Prüfgefäße**

Glasgefäße mit perforierten Kunststoffdeckeln, -platten oder -folien von ca. 1 Liter Inhalt werden mit einer Menge an feuchtem Prüf- oder Kontrollsubstrat gefüllt, die 500 g Trockengewicht des Substrats entspricht.

**1.6.2. Prüfbedingungen**

Die Gefäße werden in Klimakammern bei einer Temperatur von  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  und Dauerlicht gehalten. Die Lichtintensität beträgt 400 bis 800 Lux.

Die Versuchszeit beträgt 14 Tage, aber die Mortalität kann wahlweise 7 Tage nach Versuchsbeginn bewertet werden.

**1.6.3. Prüfverfahren****Prüfkonzentration**

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden als Gewicht der Substanz pro Trockengewicht des Grundsubstrats (mg/kg) ausgedrückt.

**Vorversuch**

In einer Vorprüfung wird der Konzentrationsbereich bestimmt, in dem 0 bis 100 % Mortalität auftritt. Der Vorversuch liefert Informationen zu dem in der Hauptprüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Die Prüfsubstanz sollte bei folgenden Konzentrationen getestet werden: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg Substanz/kg Prüfsubstrat (Trockengewicht).

Wird eine vollständige Hauptprüfung durchgeführt, reichen 1 Prüfansatz pro Konzentration und 1 pro unbehandelte Kontrolle mit je 10 Würmern für die Vorprüfung aus.

**Hauptprüfung**

Die Ergebnisse des Vorversuchs werden eingesetzt, um mindestens 5 Konzentrationen in einer geometrischen Reihe zu wählen, die den Bereich von 0 bis 100 % Mortalität umfassen, und die sich durch einen konstanten Faktor unterscheiden, der 1,8 nicht überschreitet.

Über diese Konzentrationsreihe sollten sich der  $C_{50}$ -Wert und sein Vertrauensbereich so genau wie möglich bestimmen lassen.

In der Hauptprüfung werden mindestens 4 Prüfansätze pro Konzentration und 4 unbehandelte Kontrollen mit je 10 Würmern eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Parallelansätze werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Ergeben zwei aufeinanderfolgende Konzentrationen, die sich um den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 und 100 % Mortalität, so reichen diese beiden Werte aus, um den Bereich anzugeben, in dem der  $LC_{50}$ -Wert liegt.

**Mischung des Grundprüfsubstrats und der Prüfsubstanz**

Das Prüfsubstrat sollte möglichst immer ohne andere Trägerstoffe als Wasser angesetzt werden. Unmittelbar vor Prüfbeginn wird die in deionisiertem Wasser oder einem anderen Lösungsmittel emulgierte oder dispergierte Prüfsubstanz mit dem Grundprüfsubstrat gemischt oder aber sie wird mit einem feinen chromatographischen Sprüher oder etwas Ähnlichem gleichmäßig aufgesprüht.

Wenn die Prüfsubstanz wasserunlöslich ist, wird sie in dem kleinstmöglichen Volumen eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Hexan, Aceton oder Chloroform) gelöst. Um die Prüfsubstanz zu lösen, zu dispergieren oder zu emulgieren, dürfen nur leicht flüchtige Lösungsmittel verwendet werden. Das Prüfsubstrat muß vor Gebrauch belüftet werden. Verdunstetes Wasser muß ersetzt werden. Die Kontrolle muß die gleiche Menge jeden Trägerstoffes enthalten.

Ist die Prüfsubstanz in organischen Lösungsmitteln nicht löslich, dispergierbar oder emulgierbar, werden 10 g eines Gemischs von fein gemahlenem Quarzsand und der zur Behandlung von 500 g künstlichem Boden (Trockengewicht) benötigten Menge an Prüfsubstanz mit 490 g Prüfsubstrat (Trockengewicht) gemischt.

Für jeden Prüfansatz wird feuchtes Prüfsubstrat in einer Menge, die 500 g Trockengewicht entspricht, in die einzelnen Glasgefäße gefüllt. Je 10 Würmer, die 24 Stunden lang zur Gewöhnung in einem entsprechend feuchten Grundsubstrat gehalten, dann schnell gewaschen und mit Filterpapier abgetupft wurden, werden auf das Prüfsubstrat gesetzt.

Um ein Austrocknen des Substrats zu vermeiden, werden die Gefäße mit perforierten Kunststoffdeckeln, -platten oder -folien zugedeckt und 14 Tage lang unter Versuchsbedingungen belassen.

Die Auswertung wird 14 Tage (und wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn durchgeführt. Das Substrat wird auf einer Platte aus Glas oder rostfreiem Stahl ausgebreitet. Die Würmer werden untersucht und die Überlebenden gezählt. Regenwürmer gelten als tot, wenn sie nicht auf einen leichten mechanischen Reiz am Vorderende reagieren.

Anschließend an eine Untersuchung nach 7 Tagen wird das Substrat wieder in das Prüfgefäß eingefüllt und die überlebenden Regenwürmer werden wieder auf dasselbe Prüfsubstrat gesetzt.

**1.6.4. Prüfororganismen**

Als Prüfororganismen werden adulte *Eisenia foetida* (siehe Anlage) (mindestens 2 Monate alt mit Clitellum) von 300 bis 600 mg Feuchtgewicht eingesetzt (zur Anzucht siehe Anlage).

**2. DATEN****2.1. Verarbeitung und Auswertung der Ergebnisse**

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden zusammen mit dem jeweils entsprechenden Prozentsatz an toten Regenwürmern angegeben.

Wenn die Daten es zulassen, lassen sich der  $LC_{50}$ -Wert und der Vertrauensbereich ( $p = 0,05$ ) nach Standardmethoden bestimmen (Litchfield und Wilcoxon, 1949, oder entsprechende Methode). Die  $LC_{50}$  wird in mg Prüfsubstanz pro kg Trockengewicht des Prüfsubstrats angegeben.

Ist die Konzentrationskurve zu steil, um eine Berechnung der  $LC_{50}$  zuzulassen, dann genügt es, den Wert aufgrund der graphischen Darstellung abzuschätzen.

Ergeben 2 aufeinanderfolgende Konzentrationen, die sich um den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 und 100 % Mortalität, so reichen diese beiden Werte aus, um den Bereich anzugeben, in dem die  $LC_{50}$  liegt.

**3. ABSCHLUSSBERICHT****3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- die Feststellung, daß die Prüfung in Übereinstimmung mit den oben genannten Qualitätskriterien durchgeführt wurde;
- welche Prüfung durchgeführt wurde (Vorprüfung und/oder Hauptprüfung);
- die genaue Beschreibung der Prüfbedingungen oder die Feststellung, daß die Prüfung entsprechend der angegebenen Methode durchgeführt wurde; jede Abweichung muß angegeben werden;
- die genaue Beschreibung, wie die Prüfsubstanz in das Grundprüfsubstrat eingebracht wurde;
- Angaben zu den Prüfororganismen (Art, Alter, Durchschnittsgewicht und Gewichtsbereich, Haltungs- und Anzuchtmethoden, Herkunft);
- das zur Bestimmung der  $LC_{50}$  angewendete Verfahren;
- die Prüfergebnisse einschließlich aller verwendeten Daten;
- die Beschreibung der beobachteten Symptome oder Veränderungen im Verhalten der Versuchstiere;
- die Mortalität in den Kontrollen;
- die  $LC_{50}$  oder die höchste geprüfte Konzentration ohne Mortalität und die niedrigste geprüfte Konzentration mit einer Mortalität von 100 % 14 Tage (wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn;
- das Auftragen der Konzentration-Wirkungs-Kurve;
- die Ergebnisse, die mit der Referenzsubstanz erzielt wurden, entweder in Verbindung mit der vorliegenden Prüfung oder aus vorherigen Qualitätskontrollversuchen.

**4. LITERATUR**

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Beschluß des Rates C(81)30 final.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*. Chapman and Hall, London, 331 pp.
- (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, Band 96, 1949, Seite 99.
- (5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

## ANLAGE

**Anzucht und Haltung der Würmer vor der Prüfung**

Zur Anzucht werden 30 bis 50 adulte Würmer 14 Tage lang in einem Brutkasten mit frischem Substrat gehalten. Diese Tiere können für weitere Anzuchten verwendet werden. Die aus den Kokons geschlüpften Würmer werden für die Prüfung eingesetzt, wenn sie geschlechtsreif sind (nach 2 bis 3 Monaten bei den vorgeschriebenen Bedingungen).

**Anzucht und Haltungsbedingungen**

**Klimakammer:** 20 °C ± 2 °C vorzugsweise mit Dauerlicht (400 bis 800 Lux).

**Brutkasten:** Geeignete flache Behälter von 10 bis 20 Liter Inhalt.

**Substrat:** *Eisenia foetida* kann in verschiedenen tierischen Exkrementen angezogen werden. Es wird empfohlen, ein Gemisch von 50 Vol. % Torf und 50 Vol. % Kuh- oder Pferdedung zu verwenden. Der pH-Wert sollte bei 6 bis 7 liegen (er wird mit Kalziumcarbonat eingestellt); die Ionenleitfähigkeit sollte niedrig sein (weniger als 6 mmhos oder 0,5 % Salzkonzentration). Das Substrat sollte feucht, aber nicht zu naß sein.

Neben der oben angegebenen Methode können auch andere bewährte Verfahren eingesetzt werden.

*Anmerkung: Eisenia foetida* gibt es in 2 Rassen, die von einigen Taxonomen als 2 verschiedene Arten bezeichnet werden (Bouche, 1972). Morphologisch sind sie ähnlich, doch zeigt *Eisenia foetida foetida* typische Querstreifen oder Bänder auf den Segmenten, während *Eisenia foetida andrei* diese nicht aufweist und fleckig rötlich gefärbt ist. Es sollte möglichst *Eisenia foetida andrei* verwendet werden. Andere Arten können eingesetzt werden, wenn das nötige Verfahren zur Verfügung steht.

## BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

## ZAHN-WELLENS-TEST

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Zweck des Verfahrens ist die Prüfung der potentiellen vollständigen biologischen Abbaubarkeit wasserlöslicher, nichtflüchtiger organischer Stoffe, indem diese in einem statischen Test relativ hohen Konzentrationen von Mikroorganismen ausgesetzt werden.

Eine physikalisch-chemische Adsorption an suspendierte Feststoffe kann auftreten und muß ggf. bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe 3.2).

Die Prüfsubstanzen werden in Konzentrationen verwendet, die DOC-Werten von 50 bis 400 mg/l oder CSB-Werten von 100 bis 1 000 mg/l entsprechen (DOC = Dissolved Organic Carbon, gelöster organischer Kohlenstoff; CSB = Chemischer Sauerstoffbedarf). Diese verhältnismäßig hohen Konzentrationen ermöglichen zuverlässige Analysen, Verbindungen mit toxischen Eigenschaften können den Abbauprozess verzögern oder hemmen.

Bei diesem Verfahren wird die Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs oder der chemische Sauerstoffbedarf zur Beurteilung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit der Prüfsubstanz benutzt.

Werden gleichzeitig spezifische Analysemethoden angewandt, kann die biologische Primär-Abbaubarkeit des Stoffes beurteilt werden (Abnahme der chemischen Ausgangsstruktur).

Mit diesem Verfahren können nur organische Stoffe geprüft werden, die bei der verwendeten Konzentration

- unter den Testbedingungen wasserlöslich sind,
- unter den Testbedingungen einen unbedeutenden Dampfdruck haben,
- die Bakterien nicht hemmen,
- im Testsystem nur beschränkt adsorbiert werden,
- nicht durch Schäumen aus der Testlösung verlorengehen.

Angaben über die relativen Anteile der wichtigsten Komponenten der Prüfsubstanz sind zur Interpretation der erzielten Ergebnisse insbesondere dann nützlich, wenn niedrige oder marginale Abbauwerte erhalten werden.

Informationen über die Toxizität des Stoffes gegenüber Mikroorganismen sind zur Interpretation niedriger Abbauwerte sowie zur Wahl der geeigneten Prüfkonzentration ebenfalls nützlich.

## 1.2. Definitionen und Einheiten

Der nach Ablauf des Tests erzielte Abbaugrad wird als „Biologische Abbaubarkeit im Zahn-Wellens-Test“ angegeben:

$$D_T (\%) = \left[ 1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

$D_T$  = Abbau (%) zur Zeit  $T$ ,

$C_A$  = DOC(oder CSB)-Werte des Prüfansatzes 3 Stunden nach Beginn des Tests (mg/l),

$C_T$  = DOC(oder CSB)-Werte des Prüfansatzes zur Zeit der Probenahme (mg/l),

$C_B$  = DOC(oder CSB)-Werte des Blindansatzes zur Zeit der Probenahme (mg/l),

$C_{BA}$  = DOC(oder CSB)-Werte des Blindansatzes 3 Stunden nach Beginn des Tests (mg/l).

Der Abbaugrad wird auf ganze Prozentzahlen gerundet.

Als prozentualer Abbau wird der Prozentsatz der DOC-(oder CSB)-Verminderung der Prüfsubstanz angegeben.

Die Differenz zwischen dem nach 3 Stunden gemessenen und dem berechneten oder vorzugsweise gemessenen Anfangswert stellt eine nützliche Information über die Eliminierung des Stoffes dar (siehe 3.2 „Interpretation der Ergebnisse“).

**1.3. Referenzsubstanzen**

Bei der Untersuchung neuer Stoffe können in einigen Fällen Referenzsubstanzen nützlich sein; spezifische Substanzen können jedoch nicht empfohlen werden.

**1.4. Prinzip der Methode**

Belebtschlamm, mineralische Nährstoffe und die Prüfsubstanz als einzige Kohlenstoffquelle werden in wässriger Lösung in ein Glasgefäß von 1 bis 4 Liter Volumen mit Rührwerk und Belüftungsvorrichtung gegeben. Die Suspension wird bei 20 bis 25 °C bei diffusem Licht oder in einem dunklen Raum bis zu 28 Tage gerührt und belüftet. Der Abbau wird verfolgt, indem die DOC-(oder CSB-)Werte der Lösung nach Filtration täglich oder in anderen geeigneten Zeitabständen gemessen werden. Das Verhältnis zwischen dem zur Zeit der Probenahme eliminierten DOC- (oder CSB-)Wert und dem 3 Stunden nach Beginn des Tests gemessenen Wert wird als Prozentsatz des biologischen Abbaus angegeben und dient als Maß des Abbaugrades zum betreffenden Zeitpunkt. Das Ergebnis wird jeweils gegen die Zeit graphisch aufgetragen und der biologische Abbau als Kurve dargestellt.

Wird ein spezifisches Analyseverfahren angewandt, so können Änderungen in der Konzentration der Ausgangsverbindung, die infolge des biologischen Abbaus auftreten, gemessen werden (Biologischer Primärabbau).

**1.5. Qualitätskriterien**

In einem Ringversuch ergab sich eine befriedigende Reproduzierbarkeit des Tests.

Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist weitgehend abhängig von der Variabilität des Blindansatzes und in geringem Ausmaß von der Genauigkeit der Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs sowie der Konzentration der Prüfsubstanz in der Kultursuspension.

**1.6. Prüfverfahren****1.6.1. Vorbereitung****1.6.1.1. Reagenzien**

Wasser: Trinkwasser mit einem Gehalt an organischem Kohlenstoff < 5 mg/l. Die Konzentration der Kalzium- und Magnesiumionen darf insgesamt 2,7 mMol/l nicht übersteigen; sonst ist eine ausreichende Verdünnung mit deionisiertem oder destilliertem Wasser erforderlich.

Schwefelsäure, p. a.: 50 g/l

Natriumhydroxidlösung, p. a.: 40 g/l

Mineralische Nährlösung: in 1 Liter deionisiertem Wasser ist folgendes zu lösen:

Ammoniumchlorid,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , p. a.: 38,5 g

Natriumdihydrogenphosphat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , p. a.: 33,4 g

Kaliumdihydrogenphosphat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p. a.: 8,5 g

Dikalium-mono-hydrogenphosphat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , p. a.: 21,75 g.

Dieser Ansatz dient sowohl als Nähr- als auch als Pufferlösung.

**1.6.1.2. Geräte**

Glasgefäße mit 1 bis 4 Liter Volumen (z. B. zylindrische Gefäße).

Rührwerk mit Rührelement aus Glas oder Metall an einem geeigneten Stiel (Das Rührelement sollte sich 5 bis 10 cm über dem Boden des Gefäßes bewegen). Auch ein magnetisches Rührwerk mit einem 7 bis 10 cm langen Magnetstab kann benutzt werden.

Glasrohr von 2 bis 4 mm Innendurchmesser zur Belüftung. Die Rohröffnung sollte sich rund 1 cm über dem Boden des Gefäßes befinden.

Zentrifuge (rd. 3 550 g).

pH-Meßgerät.

Gerät zur Messung des gelösten Sauerstoffs.

Papierfilter.

Membranfiltrationsgerät.

Membranfilter, Porengröße 0,45 µm. Die Membranfilter dürfen weder Kohlenstoff freisetzen noch während der Filtration absorbieren.

Analysegerät zur Bestimmung des Gehalts an organischem Kohlenstoff und Ausrüstung zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs.

## 1.6.1.3. Vorbereitung des Inokulums

Belebtschlamm aus einer biologischen Kläranlage wird gewaschen, indem er mit Wasser (der vorgeschriebenen Qualität) wiederholt zentrifugiert oder sedimentiert wird.

Der Belebtschwamm muß in einem geeigneten Zustand sein. Er ist in einer einwandfrei arbeitenden Kläranlage erhältlich. Um möglichst viele Bakterienarten oder Stämme zu erhalten, sollten evtl. Inokula aus verschiedenen Quellen gemischt werden (z. B. Schlamm aus verschiedenen Kläranlagen, Bodenextrakte, Flußwasser usw.). Das Gemisch ist nach obiger Beschreibung zu behandeln.

Zur Prüfung der Aktivität des Belebtschlammes siehe „Funktionskontrolle“ (unter 1.6.2).

## 1.6.1.4. Zubereitung der Testlösungen

In das Testgefäß sind 500 ml Wasser, 2,5 ml/l mineralische Nährlösung und Belebtschlamm in einer Menge von 0,2 bis 1,0 g/l Trockenmasse im Endgemisch zu geben. Man gebe genügend Stammlösung der Prüfsubstanz hinzu, um eine DOC-Konzentration von 50 bis 400 mg/l in der Kultursuspension zu erhalten. Die entsprechenden CSB-Werte sind 100 bis 1 000 mg/l. Dann wird mit Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 bis 4 Liter aufgefüllt. Das zu wählende Gesamtvolumen ist abhängig von der Anzahl Proben für die DOC- oder CSB-Bestimmungen und vom für das Analyseverfahren benötigten Probevolumen.

In der Regel sind 2 Liter ausreichend. Gleichzeitig mit jeder Testserie ist zumindest eine Kontrolle durchzuführen; der Kontrollansatz (Blindprobe) hierfür enthält nur Belebtschlamm und Mineralnährlösung und wird mit Wasser auf das gleiche Volumen wie die Prüfansätze aufgefüllt.

## 1.6.2. Durchführung der Prüfung

Die Kulturgefäße werden bei diffusem Licht oder in einer Dunkelkammer bei 20 bis 25 °C inkubiert und mit Hilfe eines magnetischen Rührwerks oder eines Schraubenpropellers gerührt. Die Belüftung erfolgt mit Druckluft, die — falls erforderlich — mit einem Wattefilter oder einer Waschflasche zu reinigen ist. Es ist dafür zu sorgen, daß sich der Schlamm nicht absetzt und die Sauerstoffkonzentration nicht unter 2 mg/l sinkt.

Der pH-Wert ist in regelmäßigen Abständen zu prüfen (z. B. täglich) und ggf. auf 7 bis 8 einzustellen.

Verdunstungsverluste werden vor jeder Probenahme mit deionisiertem oder destilliertem Wasser ausgeglichen. Hierfür ist es zweckmäßig, das Flüssigkeitsniveau am Gefäß vor Beginn des Tests zu markieren. Nach jeder Probenahme wird bei ausgeschalteter Belüftung und Rührung eine neue Marke angebracht. Die ersten Proben werden jeweils drei Stunden nach Beginn des Tests entnommen, um die Absorption der Prüfsubstanz an den Belebtschlamm zu ermitteln.

Die Elimination der Prüfsubstanz wird verfolgt, indem täglich oder in anderen regelmäßigen Zeitabständen die DOC- oder CSB-Werte bestimmt werden. Die Proben aus dem Prüfansatz und die Blindproben werden durch ein sorgfältig gewaschenes Papierfilter filtriert. Die ersten 5 ml des Filtrats sind zu verwerfen. Schwer zu filtrierende Suspensionen können zuvor durch Zentrifugation (10 Minuten) vorgereinigt werden. Die DOC- und DSB-Bestimmungen werden mindestens doppelt ausgeführt. Die Ansätze werden bis zu 28 Tage inkubiert.

*Anmerkung:* Proben, die nach dieser Behandlung noch trüb sind, werden durch Membranfilter filtriert. Die Membranfilter dürfen keine organischen Stoffe freisetzen oder adsorbieren.

## Funktionskontrolle des Belebtschlammes

Parallel zu jeder Testserie ist ein Ansatz mit einer Substanz, deren Abbauverhalten bekannt ist, zu prüfen, um die Abbau-Kapazität des Belebtschlammes zu kontrollieren. Diäthylenglykol hat sich hierfür als zweckmäßig erwiesen.

## Adaptation

Werden Analysen in relativ kurzen Zeitabständen (z. B. täglich) durchgeführt, so läßt sich die Adaptation aufgrund der Abbaukurve klar erkennen (siehe Abbildung 2). Der Test sollte deshalb nicht unmittelbar vor einem Wochenende begonnen werden. Erfolgt die Adaptation am Ende der normalen Testdauer, so kann der Test bis zum vollständigen Abbau der Prüfsubstanz verlängert werden.

*Anmerkung:* Ist eine eingehendere Kenntnis über das Verhalten des adaptierten Belebtschlammes erforderlich, so wird dieser nach folgendem Verfahren ein weiteres Mal mit der gleichen Prüfsubstanz inkubiert:

Rührwerk und Belüftung werden ausgeschaltet, damit sich der Belebtschlamm absetzen kann. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, man füllt mit Wasser (Testqualität) auf 2 Liter auf, rührt 15 Minuten lang und läßt den Schlamm absetzen. Die überstehende Flüssigkeit wird wiederum entfernt und der Test mit dem verbleibenden Schlamm und der gleichen Prüfsubstanz wie oben unter 1.6.1.4 und 1.6.2 beschrieben wiederholt. Der Belebtschlamm kann auch durch Zentrifugieren anstatt durch Absetzen gewonnen werden.

Der adaptierte Schlamm kann mit frischem Belebtschlamm gemischt werden, so daß wiederum 0,2 bis 1 g Trockengewicht pro Liter in der Kultursuspension erreicht werden.

### Vorbereitung für die Analyse

Die Proben werden in der Regel durch ein sorgfältig gewaschenes Papierfilter filtriert (zum Waschen verwende man entionisiertes Wasser).

Trübe Proben werden durch Membranfilter (0,45 µm) filtriert.

Die DOC-Konzentration wird in Probefiltraten (die ersten 5 ml werden verworfen) mit dem TOC-Meßgerät doppelt bestimmt. Kann das Filtrat nicht am gleichen Tag analysiert werden, so muß es bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt werden. Von längeren Lagerungen wird abgeraten.

Die CSB-Konzentration der Probefiltrate wird nach dem in der Literaturangabe <sup>(2)</sup> beschriebenen Verfahren bestimmt.

## 2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die DOC- und CSB-Konzentrationen werden in den Proben, wie oben in 1.6.2 beschrieben, mindestens doppelt bestimmt. Der Abbau zum Zeitpunkt T wird nach der unter 1.2 oben angegebenen Formel mit den Definitionen berechnet.

Der Abbaugrad wird auf ganze Prozentzahlen aufgerundet. Der nach Ablauf des Tests erreichte Abbau wird als „Biologische Abbaubarkeit im Zahn-Wellens-Test“ angegeben.

*Anmerkung:* Wird vor Ablauf der Testzeit ein vollständiger Abbau erreicht und dieses Ergebnis in einer zweiten Analyse am nächsten Tag bestätigt, so kann die Prüfung beendet werden.

## 3. SCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Substanzkonzentration zu Beginn des Tests;
- sämtliche Informationen und experimentellen Ergebnisse, die mit der Prüfsubstanz, ggf. der Referenzsubstanz sowie der Blindprobe erhalten wurden;
- Substanzkonzentration nach drei Stunden;
- Abbau-Kurve mit Beschreibung;
- Datum und Ort der Entnahme der Organismen, Stand der Adaptation, verwendete Konzentration usw.;
- wissenschaftliche Gründe für jedwede Änderungen des Testverfahrens.

### 3.2. Interpretation der Ergebnisse

Eine fortschreitende Abnahme des DOC (CSB) innerhalb von Tagen oder Wochen weist auf einen biologischen Abbau des Teststoffes hin.

Eine physikalisch-chemische Adsorption kann jedoch in manchen Fällen auch eine Rolle spielen; ein Hinweis darauf besteht, wenn während der ersten drei Stunden eine vollständige oder teilweise DOC-(CSB-)Abnahme festgestellt wird und der Unterschied zwischen der überstehenden Flüssigkeit in den Proben aus dem Kontrollgefäß und dem Testgefäß unerwartet niedrig ist.

Soll zwischen vollständigem (oder teilweisem) biologischem Abbau und Adsorption unterschieden werden, sind weitere Tests erforderlich. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an; am besten verwendet man jedoch überstehende Kultursuspension aus dem Prüfansatz als Inokulum in einem Grundstufen-Test (vorzugsweise in einem respirometrischen Test).

Prüfsubstanzen, die eine weitgehende, nicht durch Adsorption bedingte Abnahme des DOC-(CSB)Gehalts in diesem Test aufweisen, sind als potentiell biologisch abbaubar zu betrachten. Eine partielle nichtadsorptive Abnahme weist darauf hin, daß der Stoff zumindest teilweise biologisch abbaubar ist.

Erfolgt keine oder nur eine geringe DOC-(CSB)Abnahme, kann dies möglicherweise auf einer Hemmung der Mikroorganismen durch den zu prüfenden Stoff beruhen. Eine Hemmung kann sich auch durch Auflösung und Verlust des Schlammes sowie einer Trübung der überstehenden Kultursuspension zeigen. In solchen Fällen ist die Prüfung mit einer niedrigeren Konzentration des zu prüfenden Stoffes zu wiederholen.

Durch spezifische Analysemethoden oder den Einsatz  $^{14}\text{C}$ -markierter Prüfsubstanzen läßt sich evtl. eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Wird  $^{14}\text{C}$ -markierte Prüfsubstanz verwendet, läßt sich durch Nachweis des entstehenden  $^{14}\text{CO}_2$  bestätigen, daß ein biologischer Abbau stattgefunden hat.

Werden die Ergebnisse auch in Form des biologischen Primär-Abbaus angegeben, so sollten, wenn möglich, Angaben über die Veränderungen der chemischen Struktur gemacht werden, die die mangelnde Wiederauffindung der Ausgangssubstanz begründen.

Die Eignung der Analysemethode sowie die damit bestimmten Werte im Nährmedium ohne Zusatz der Prüfsubstanz müssen angegeben werden.

## 4.

## LITERATUR

- (1) OECD Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Beschluß des Rates C(81) 30 Final.
- (2) Anhang V C.9 Abbaubarkeit: Chemischer Sauerstoffbedarf Richtlinie der Kommission 84/449/EWG (*Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* Nr. L 251 vom 19. September 1984).

## Anlage

## BEISPIEL EINER AUSWERTUNG

<b>Organische Verbindung:</b>	4-Äthoxybenzoesäure
Theoretische Testkonzentration:	600 mg/l
Theoretischer DOC-Gehalt:	390 mg/l
<b>Impfgut (Inokulum):</b>	Kläranlage . . .
Konzentration:	1 Gramm Trockensubstanz/l
Stand der Adaptation:	nicht adaptiert
<b>Analyse:</b>	DOC-Bestimmung
<b>Probemenge:</b>	3 ml
<b>Kontrollsubstanz:</b>	Diäthylenglykol
<b>Toxizität der Verbindung:</b>	keine toxische Wirkung unter 1 000 mg/l
	Angewandter Test: Gärröhrentest

Zeit	Kontrollsubstanz				Prüfsubstanz		
	Blindansatz DOC <sup>(1)</sup> mg/l	DOC <sup>(1)</sup> mg/l	Netto DOC mg/l	Abbau %	DOC <sup>(1)</sup> mg/l	Netto DOC mg/l	Abbau %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 Std.	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 Tag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 Tage	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 Tage	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 Tage	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 Tage	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 Tage	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 Tage	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 Tage	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

<sup>(1)</sup> Mittelwerte aus dreifacher Bestimmung.

Abbildung 1

Beispiele von Abbau-Kurven

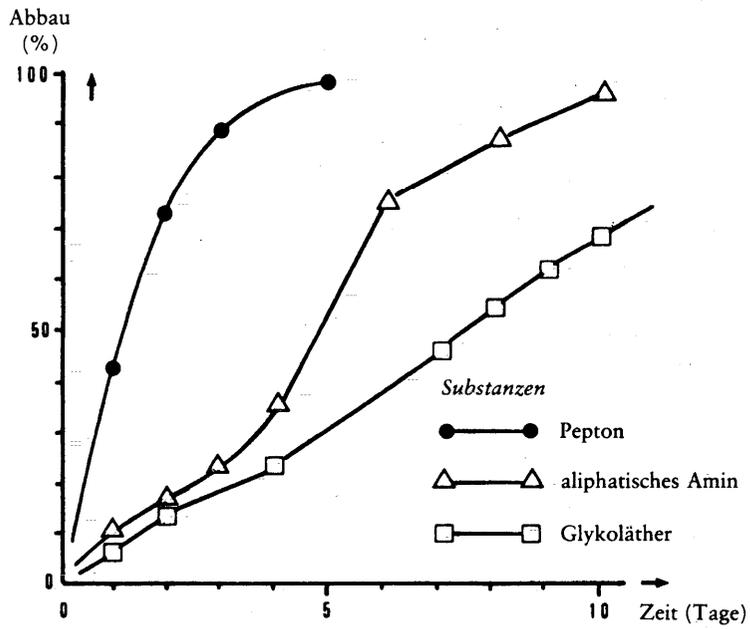
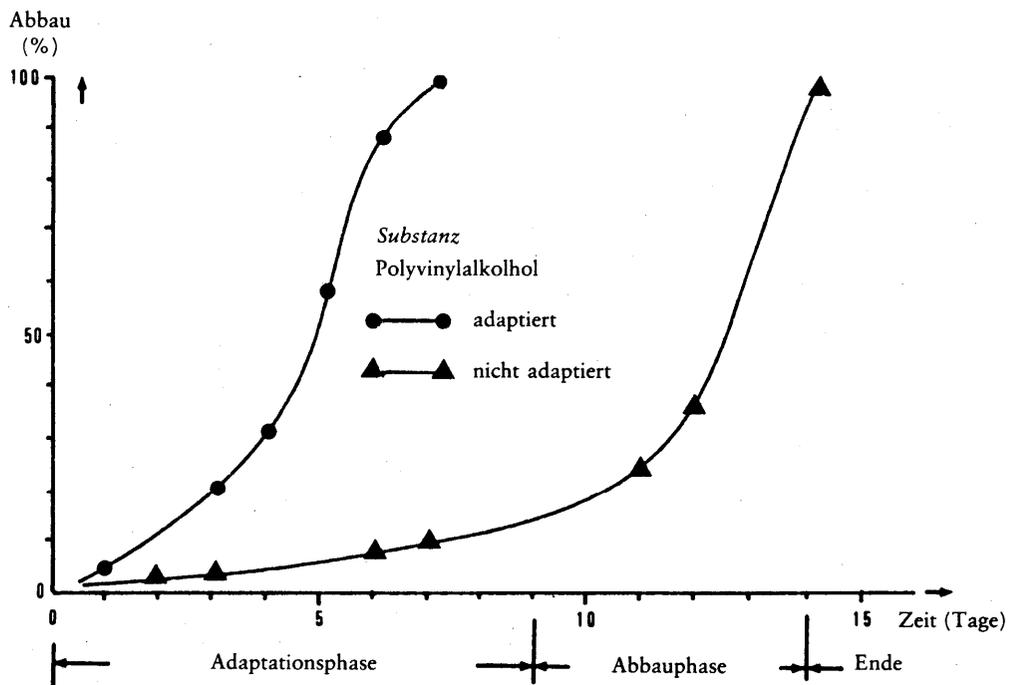


Abbildung 2

Beispiel für eine Adaptation des Schlammes



## BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

## SIMULATIONSTEST MIT BELEBTSCHLAMM

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

## 1.1.1. Allgemeines

Die Methode ist nur für organische Substanzen geeignet, die bei den im Test verwendeten Konzentrationen

- in dem zur Herstellung der Testlösungen erforderlichen Maße in Wasser löslich sind;
- unter den Prüfbedingungen einen vernachlässigbar niedrigen Dampfdruck haben;
- die Bakterien nicht hemmen.

Angaben über die relativen Anteile der wichtigsten Bestandteile der Prüfsubstanz sind für die Interpretation der Ergebnisse nützlich, insbesondere wenn die Abbauwerte niedrig oder marginal sind.

Informationen über die Toxizität der Substanz für Mikroorganismen können für die Interpretation niedriger Abbauwerte und die Wahl der geeigneten Prüfkonzentrationen von Nutzen sein.

1.1.2. Prüfung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit (DOC<sup>(1)</sup>/CSB<sup>(2)</sup>-Analyse)

Zweck des Verfahrens ist die Prüfung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen durch Messung der Abnahme der Prüfsubstanz sowie möglicher Metaboliten in einer Belebtschlamm-Modellanlage bei einer Konzentration von 12 mg DOC/l (oder etwa 40 mg CSB/l). 20 mg DOC/l haben sich als günstig erwiesen.

Der Gehalt der Prüfsubstanz an organischem Kohlenstoff (oder der chemische Sauerstoffbedarf) müssen bekannt sein.

## 1.1.3. Bestimmung der biologischen Primär-Abbaubarkeit (Spezifische Analyse)

Zweck dieses Verfahrens ist die Prüfung der biologischen Primär-Abbaubarkeit einer Substanz in einer Belebtschlamm-Modellanlage bei einer Konzentration von etwa 20 mg Substanz/l unter Verwendung einer substanzspezifischen Analysenmethode (niedrige oder höhere Konzentrationen können eingesetzt werden, wenn die analytische Methode und die Toxizität dies erlauben). Dieses Verfahren ermöglicht die Beurteilung der Primär-Abbaubarkeit der Substanz (Verschwinden der ursprünglichen chemischen Struktur).

Es ist *nicht* Zweck dieses Verfahrens, die Mineralisierbarkeit der Prüfsubstanz zu bestimmen.

Für die quantitative Analyse der Prüfsubstanz muß ein geeignetes Verfahren zur Verfügung stehen.

## 1.2. Definitionen und Einheiten

## 1.2.1. DOC/CSB-Analyse

Die Abnahme der Substanz ist gegeben durch

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 a)]$$

Darin sind:

DR = DOC- (oder CSB-)Abnahme in % bei der gegebenen mittleren Verweilzeit, bezogen auf die eingesetzte Prüfsubstanz,

T = Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf in mg DOC/l (oder mg CSB/l),

E = DOC- (oder CSB-)Konzentration im Ablauf in mg/l,

E<sub>0</sub> = DOC- (oder CSB-)Konzentration im Ablauf der Kontrollanlage in mg/l.

Als Abbau wird die prozentuale DOC- (oder CSB-)Abnahme bei der gegebenen Verweilzeit, bezogen auf die eingesetzte Prüfsubstanz, angegeben.

(<sup>1</sup>) DOC = Dissolved Organic Carbon = Gelöster organischer Kohlenstoff.

(<sup>2</sup>) CSB = Chemischer Sauerstoffbedarf.

### 1.2.2. Spezifische Analyse

Die prozentuale Elimination der Prüfsubstanz aus der wäßrigen Phase ( $R_w$ ) innerhalb der gegebenen mittleren Verweilzeit ist gegeben durch

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100\% \quad [1 b)]$$

Darin sind:

$C_1$  = Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf der Prüfanlage (mg Substanz/l, bestimmt durch spezifische Analyse),

$C_0$  = Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf der Prüfanlage (mg Substanz/l), bestimmt durch spezifische Analyse).

### 1.3. Referenzsubstanzen

Wenn eine neue Substanz untersucht wird, sind Referenzsubstanzen in manchen Fällen nützlich. Hier kann jedoch noch keine bestimmte Substanz empfohlen werden.

### 1.4. Prinzip der Methoden

Um die vollständige biologische Abbaubarkeit zu prüfen, sind zwei Belebtschlamm-Modellanlagen (OECD Confirmatory Test-Einheit oder „Porous pot“), die parallel betrieben werden, erforderlich. Die Prüfsubstanz wird dem Zulauf (synthetisches oder kommunales Abwasser) einer der beiden Anlagen zugesetzt, während die andere Anlage nur das Abwasser erhält.

Um die biologische Primär-Abbaubarkeit mit Hilfe spezifischer Analysen der Prüfsubstanz im Zu- und Ablauf zu bestimmen, ist nur eine Anlage erforderlich.

Die DOC- (oder CSB-)Konzentrationen werden in den Abläufen gemessen, oder es werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz über die spezifische Analyse bestimmt.

Der Gesamt-DOC-Gehalt der Nährlösung (Abwasser + Prüfsubstanz) muß nicht gemessen, sondern kann als Summe der beiden Einzelwerte angegeben werden.

Bei DOC- (oder CSB-)Messungen geht man davon aus, daß die Differenz der Konzentrationen zwischen Prüf- und Kontrollablauf auf nicht abgebaute Prüfsubstanz beruht.

Mit Hilfe spezifischer Analysen läßt sich die Änderung der Konzentration der Ausgangssubstanz messen (biologischer Primär-Abbau).

Die Anlagen können nach einem Überimpfungsverfahren gekoppelt betrieben werden.

### 1.5. Qualitätskriterien

Die Ausgangskonzentration der Prüfsubstanz ist unter Berücksichtigung der Art der Analyse und ihrer jeweiligen Erfassungsgrenze zu wählen.

### 1.6. Beschreibung des Prüfverfahrens

#### 1.6.1. Vorbereitung

##### 1.6.1.1. Geräte

Wenn nicht mit spezifischer Analytik gearbeitet wird, werden zwei Modellanlagen gleichen Typs benötigt. Zwei Anlagentypen stehen zur Verfügung, die wahlweise eingesetzt werden können:

##### OECD-Confirmatory-Test-Anlage

Die Anlage besteht aus einem Vorratsgefäß (A) für das Abwasser, einer Dosierpumpe (B), einem Belüftungsgefäß (C), einem Absetzgefäß (D), einem Druckluftheber (E) zur Rückführung des Belebtschlammes sowie einem Sammelgefäß für den behandelten Ablauf (F).

Die Gefäße A und F müssen aus Glas oder geeignetem Kunststoff bestehen und mindestens 24 Liter fassen. Die Pumpe (B) muß einen konstanten Zustrom des Abwassers zum Belüftungsgefäß erlauben. Jedes geeignete System, das einen bestimmten Zustrom sowie eine bestimmte Konzentration gewährleistet, kann eingesetzt werden.

Bei normalem Betrieb wird die Höhe des Absetzgefäßes (D) so eingestellt, daß das Volumen der Kultursuspension im Belüftungsgefäß 3 Liter beträgt. In der kegelförmigen Spitze des Belüftungsgefäßes befindet sich ein gesinterter, poröser Stein zur Belüftung. Die Belüftungsrate muß mit Hilfe eines Durchflußmessers kontrolliert werden. Der Druckluftheber (E) ist so eingestellt, daß der Belebtschlamm kontinuierlich und regelmäßig vom Absetzgefäß in das Belüftungsgefäß zurückgeführt wird.

#### „Porous pot“-Anlage

Der „Porous pot“ ist folgendermaßen konstruiert: Poröse Polyethylenfolien (Dicke: 2 mm; max. Porengröße: 95 µ) bilden einen Zylinder (Ø : 14 cm) mit einem konischen Ende (45°) (siehe Abbildung 1 und 2 in Anlage 2). Der „Porous pot“ befindet sich in einem undurchlässigen Gefäß (Ø 15 cm) aus geeignetem Kunststoff, das in seinem zylindrischen Teil in der Höhe von 17,2 cm bei einem Volumen vom 3 Liter einen Auslaß aufweist. Am oberen Ende des Innengefäßes ist ein starrer Halterungsring aus Kunststoff so angebracht, daß zwischen Außen- und Innengefäß 0,5 cm Ablaufraum liegen. Der „Porous pot“ kann in ein durch einen Thermostaten kontrolliertes Wasserbad montiert werden. Über eine Luftzufuhr zum Boden des Innengefäßes wird mit Hilfe eines geeigneten Verteilers belüftet.

Die Gefäße (A) und (E) müssen aus Glas oder einem geeigneten Kunststoff bestehen und mindestens 24 Liter fassen. Die Pumpe (B) muß einen konstanten Zustrom des Abwassers in das Belüftungsgefäß erlauben. Jedes geeignete System kann verwendet werden, vorausgesetzt, daß ein bestimmter Zustrom und eine bestimmte Konzentration gewährleistet sind.

Zusätzliche „Porous-pot“-Gefäße sind erforderlich, damit ein Gefäß, das während des Gebrauchs verstopft ist, ersetzt werden kann. Verstopfte Gefäße werden 24 Stunden in Hypochloritlösung gelegt und anschließend gründlich mit Leitungswasser gespült.

#### 1.6.1.2. Filtration

Es sind Membranfiltrationsgeräte und Membranfilter (Porengröße: 0,45 µ) erforderlich. Die Membranfilter dürfen weder Kohlenstoff freisetzen noch die Substanz beim Filtrieren adsorbieren.

#### 1.6.1.3. Abwasser

Es kann wahlweise geeignete synthetische Nährlösung oder kommunales Abwasser verwendet werden.

##### Beispiel für synthetische Nährlösung

Pro Liter Leitungswasser sind zu lösen:

Pepton:	160 mg,
Fleischextrakt:	110 mg,
Harnstoff:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O:	4 mg,
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O:	2 mg,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	28 mg.

##### Häusliches Abwasser

Es ist jeden Tag frisch vom Überlauf der mechanischen Stufe einer Kläranlage, die hauptsächlich kommunale Abwässer reinigt, zu entnehmen.

#### 1.6.1.4. Stammlösung der Prüfsubstanz

Es wird eine Lösung der Prüfsubstanz, z. B. 1 %ig, angesetzt. Die Konzentration der Prüfsubstanz muß bestimmt werden, um ein geeignetes Volumen zur Einstellung der erforderlichen Prüfkonzentration in der Kultursuspension ermitteln zu können. Dies wird dann entweder dem Abwasser zugesetzt oder kontinuierlich über eine zweite Pumpe direkt in das Belüftungsgefäß gegeben.

#### 1.6.1.5. Inokulum

*Anmerkung:* Wird kommunales Abwasser verwendet, ist es wenig zweckmäßig, ein Inokulum mit geringer Bakterienkonzentration zu wählen; hier ist Belebtschlamm einzusetzen.

Es können Inokula verschiedener Herkunft eingesetzt werden.

Hier werden drei Beispiele für geeignetes Impfgut angegeben:

##### a) Inokulum aus Kläranlagenablauf

Das Inokulum wird vorzugsweise dem Ablauf einer gut arbeitenden Kläranlage, in der hauptsächlich kommunale Abwässer gereinigt werden, entnommen. Die Suspension muß zwischen Probenahme und Verwendung aerob gehalten werden. Zur Aufbereitung des Inokulums wird die Probe durch ein grobes Filter gegeben, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Das Filtrat wird bis zur Verwendung aerob gehalten. Das Impfgut muß am gleichen Tag verwendet werden. Zur Beimpfung müssen mindestens 3 ml eingesetzt werden.

## b) Misch-Inokulum

Inokulum aus einem Kläranlagenablauf:

Siehe oben.

Inokulum aus Boden:

100 g Gartenboden (fruchtbarer, nicht steriler Boden) werden in 1 Liter chlorfreiem Trinkwasser suspendiert. (Böden mit sehr hohem Gehalt an Ton, Sand oder Humus sind ungeeignet.) Nach dem Umrühren läßt man die Suspension für 30 Minuten absetzen. Der Überstand wird durch ein großes Filter gegeben, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Das Filtrat wird sofort und bis zur Verwendung belüftet. Das Inokulum muß am gleichen Tag verwendet werden.

Inokulum aus Oberflächenwasser

Ein weiterer Anteil des Mischinokulums wird von einem mesosaprobischen Oberflächenwasser gewonnen. Die Probe wird durch ein grobes Filter gegeben, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Bis zur Verwendung wird das Filtrat aerob gehalten. Das Inokulum muß am gleichen Tag verwendet werden.

Die drei verschiedenen Impfsuspensionen werden zu gleichen Teilen gut gemischt. Mindestens 3 ml dieser Suspension sind für die Beimpfung einzusetzen.

## c) Inokulum aus Belebtschlamm

Ein Volumen von nicht mehr als 3 Liter Belebtschlamm (Gehalt an suspendierten Feststoffen bis zu 2,5 g/l) vom Belüftungsbecken einer Kläranlage, die hauptsächlich kommunales Abwasser reinigt, wird als Inokulum verwendet.

## 1.6.2. Prüfverfahren

Der Test wird bei einer Raumtemperatur von 18° C bis 25° C durchgeführt. Gegebenenfalls kann der Test bei einer niedrigeren Temperatur (bis zu 10 °C) durchgeführt werden: Wenn die Prüfsubstanz unter diesen Bedingungen abgebaut wird, sind normalerweise keine weiteren Untersuchungen erforderlich. Wird die Substanz jedoch nicht abgebaut, muß der Test bei 18 bis 25° C wiederholt werden.

## 1.6.2.1. Anlaufphase: Schlamm- / Stabilisierung der Anlagen

Die Schlammwachstums-/Stabilisierungsphase ist der Zeitraum, in dem die Konzentration der im Belebtschlamm suspendierten Feststoffe und der Betrieb der Anlagen bei den gegebenen Betriebsbedingungen ein Fließgleichgewicht erreichen.

Die Anlaufphase ist der Zeitraum beginnend mit der ersten Zugabe der Prüfsubstanz bis zu dem Zeitpunkt, zu dem ihre Abnahme ein Plateau erreicht (d. h. ein verhältnismäßig konstanter Wert gemessen wird). Dieser Zeitraum darf sechs Wochen nicht überschreiten.

Die Auswertungsphase ist ein Zeitraum von drei Wochen, beginnend drei Wochen nachdem die Abnahme der Prüfsubstanz einen relativ konstanten und gewöhnlich hohen Wert erreicht hat. Für Substanzen, die in den ersten sechs Wochen wenig oder gar nicht abgebaut werden, werden die darauffolgenden drei Wochen als Auswertungsphase gewählt.

Zunächst wird in die für den Test vorgesehene Anlage (oder die Anlagen) das mit Abwasser gemischte Inokulum gefüllt. Dann wird die Belüftung (und bei Verwendung der OECD-Confirmatory-Test-Anlage) durch Mammtpumpe sowie das Dosiergerät in Betrieb gesetzt.

Der Zulauf (Abwasser) ohne Prüfsubstanz muß das Belüftungsgefäß entweder mit einer Rate von 1 Liter/Std. oder von 1/2 Liter/Std. durchfließen; dies ergibt eine mittlere Verweilzeit von drei bzw. sechs Stunden.

Die Belüftung muß so reguliert sein, daß der Inhalt im Belüftungsgefäß immer in Suspension ist und der Gehalt an gelöstem Sauerstoff mindestens 2 mg/l beträgt.

Ein Schäumen muß mit geeigneten Mitteln verhindert werden. Antischäummittel, die den Belebtschlamm hemmen, dürfen nicht eingesetzt werden.

Schlamm, der sich am oberen Ende der Belüftungsgefäße (und im Falle der „OECD-Confirmatory Test“-Anlage am Boden des Absetzgefäßes sowie im Rücklaufsystem) angesammelt hat, muß mindestens einmal täglich durch Bürsten oder andere geeignete Maßnahmen in die Kultursuspension zurückgeführt werden.

Wenn der Schlamm sich nicht absetzt, kann seine Dichte durch Zugabe von 2 ml einer 5 %igen Eisen(III)chloridlösung erhöht werden; dies wird so oft wie nötig wiederholt.

Der Ablauf wird 20 bis 24 Stunden lang in den Gefäßen (E) oder (F) gesammelt; bevor eine Probe genommen wird, muß gründlich gemischt werden. Die Gefäße (E) oder (F) sind sorgfältig zu reinigen.

Um die Effektivität des Verfahrens zu verfolgen und zu kontrollieren, werden CSB oder DOC des Filtrats vom gesammelten Ablauf mindestens zweimal wöchentlich gemessen. Ebenso werden CSB und DOC des filtrierten Zulaufs bestimmt. Zur Filtration werden Membranfilter, Porengröße 0,45 µm benutzt; die jeweils ersten 20 ml des Filtrats werden verworfen.

Die Differenz im CSB- oder DOC-Gehalt aufeinanderfolgender Messungen wird geringer, wenn sich der Abbauprozess stabilisiert.

Der Trockensubstanzgehalt (in g/l) des Belebtschlammes im Belüftungsgefäß sollte ebenfalls zweimal wöchentlich bestimmt werden. Die Anlagen können nach zweierlei Arbeitsweisen betrieben werden: Entweder wird der Trockensubstanzgehalt des Belebtschlammes zweimal wöchentlich bestimmt (falls er höher als 2,5 g/l liegt, muß der überschüssige Belebtschlamm verworfen werden) oder es werden täglich 500 ml der Kultursuspension aus den Belüftungsgefäßen entfernt, so daß sich für den Schlamm eine mittlere Verweilzeit von sechs Tagen ergibt.

Wenn die gemessenen und geschätzten Parameter (dies sind: Effektivität des Verfahrens (CSB- oder DOC-Abnahme, Schlammkonzentration, Absetzbarkeit des Schlammes, Trübung des Überstands usw.) der beiden Anlagen ausreichend stabil sind, kann die Prüfsubstanz, wie unter 1.6.2.2 beschrieben, in den Zulauf einer der beiden Anlagen gegeben werden.

Alternativ kann die Prüfsubstanz zu Beginn der Schlammwachstumsphase (1.6.2.1.) hinzugefügt werden, insbesondere dann, wenn Belebtschlamm als Inokulum eingesetzt wird.

#### 1.6.2.2. Prüfverfahren

Unter Einhaltung der Betriebsbedingungen der Anlaufphase wird die Stammlösung der Prüfsubstanz (etwa 1 %ig) dem Zulauf der Prüfanlage zugesetzt, so daß die Substanz in der gewünschten Konzentration vorliegt (etwa 10—20 mg DOC/l oder 40 mg CSB/l).

Die Stammlösung kann hierfür entweder täglich dem Abwasser beigemischt oder mittels eines getrennten Pumpsystems der Kultursuspension zugesetzt werden. Die Konzentration kann schrittweise bis zur gewünschten Konzentration erhöht werden. Wenn die Prüfsubstanz auf den Belebtschlamm nicht toxisch wirkt, können auch höhere Konzentrationen als oben angegeben geprüft werden.

In die Kontrollanlage wird nur Abwasser, aber keine Prüfsubstanz gegeben. Vom Ablauf werden geeignete Mengen für die Analyse entnommen und membranfiltriert (Porengröße 0,45 µm), wobei die ersten 20 ml des Filtrats verworfen werden.

Die filtrierten Proben müssen entweder am gleichen Tag analysiert oder bis zur Analyse durch geeignete Methoden konserviert werden (z. B. durch 0,05 ml einer 1 %igen Quecksilberchloridlösung/10 ml Filtrat oder indem sie bei 2 bis 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -18 °C für längere Zeit aufbewahrt werden).

Die Anlaufphase ab Zugabe der Prüfsubstanz sollte sechs Wochen nicht überschreiten; die Auswertungsphase sollte nicht kürzer als drei Wochen sein, so daß 14 bis 20 Bestimmungen für die Berechnung des Endergebnisses zur Verfügung stehen.

#### Gekoppelte Anlagen

Die Anlagen werden gekoppelt, indem 1 × täglich 2,5 Liter der Kultursuspension (einschl. Schlamm) aus den Belüftungsgefäßen zwischen den beiden Anlagen ausgetauscht werden. Wenn die Prüfsubstanz stark adsorbiert, werden 1,5 Liter des Überstands aus den Absetzgefäßen entnommen und jeweils in das Belüftungsgefäß der anderen Anlage gegeben.

#### 1.6.2.3. Analytik

Um das Verhalten der Prüfsubstanz zu verfolgen, werden zwei Arten von Analysen durchgeführt:

##### DOC- und CSB-Analysen

Die DOC-Konzentrationen werden in doppelter Ausführung mit einem Kohlenstoffanalysator gemessen und/oder die CSB-Werte nach Lit. 2 bestimmt.

##### Spezifische Analyse

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden mit einer geeigneten analytischen Methode bestimmt. Wenn möglich, soll auch die an den Schlamm adsorbierte Substanz erfaßt werden.

## 2. DATEN UND AUSWERTUNG

### 2.1. Gekoppelte Anlagen

Wird das Verfahren mit gekoppelten Anlagen angewandt, ist die prozentuale Abnahme (DR) gemäß 1.2.1 täglich zu berechnen.

Diese täglich berechneten Werte der Abnahme werden zu DR<sub>c</sub> korrigiert, da die Übertragung von Material durch die Überimpfung zu berücksichtigen ist. Dies erfolgt nach Gleichung [2] für eine mittlere Aufenthaltszeit von drei Stunden und nach Gleichung [3] für eine mittlere Retentionszeit von sechs Stunden.

$$\text{DRc} = \frac{8}{7} \text{DR} - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$\text{DRc} = \frac{4}{3} \text{DR} - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Der Mittelwert der Reihe von DRc-Werten wird errechnet, die Standardabweichung ergibt sich nach Gleichung [4]

$$S_{\text{DRc}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{\text{DRc}} - \text{DRc}_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

Darin sind:

$S_{\text{DRc}}$  = Standardabweichung der Reihe von DRc-Werten,

$\overline{\text{DRc}}$  = Mittelwert der DRc-Werte,

$n$  = Anzahl der Bestimmungen.

Ausreißer in der Reihe der DRc-Werte werden nach geeigneten statistischen Verfahren, z. B. nach Nalimov [6], bei einer statistischen Sicherheit von 95 % eliminiert; Mittelwert und Standardabweichung werden aus den ausreißerfreien DRc-Daten neu berechnet:

Das Endresultat wird dann mit der Gleichung [5] errechnet.

$$\text{DRc} = \overline{\text{DRc}} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{\text{DRc}} \quad [5]$$

Darin sind:

$t_{n-1;\alpha}$  = Tabellenwert von t für  $n$  Wertepaare von  $e$  und  $E_0$  und einem statistischen Vertrauensbereich  $P$  ( $P = 1 - \alpha$ ), wobei  $P = 95\%$  gesetzt wird (1).

Als Ergebnis wird der Mittelwert mit einer Sicherheit von 95 %, die jeweilige Standardabweichung, die Anzahl an Daten der ausreißerfreien DRc-Werte sowie die Anzahl der Ausreißer angegeben.

Beispiel:

$\text{DRc} = 98,6 \pm 2,3\%$  DOC-Abnahme,

$s = 4,65\%$  DOC-Abnahme,

$n = 18$ ,

$x$  = Anzahl der Ausreißer.

## 2.2. Nicht gekoppelte Anlagen

Die Betriebsleistung der Anlagen kann folgendermaßen überprüft werden:

$$\% \text{ Abnahme des CSB oder DOC} = \frac{\text{CSB oder DOC des Abwassers} - \text{CSB oder DOC des Ablaufs}}{\text{CSB oder DOC des Abwassers}} \times 100$$

Wenn die täglich gemessene Abnahme graphisch dargestellt wird, werden alle Trends, z. B. eine Adaptation, verdeutlicht.

### 2.2.1. Verfahren mit CSB/DOC-Bestimmungen

Die täglich gemessene prozentuale Abnahme DR wird gemäß 1.2.1 berechnet. Der Mittelwert der Reihe von DR-Werten wird errechnet; die Standardabweichung ergibt sich nach [6]

$$S_{\text{DR}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{\text{DR}} - \text{DR}_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

Darin sind:

$S_{\text{DR}}$  = Standardabweichung der Reihe von  $\text{DR}_i$ -Werten,

$\overline{\text{DR}}$  = Mittelwert der  $\text{DR}_i$ -Werte,

$n$  = Anzahl der Bestimmungen.

Ausreißer in der Reihe der DR-Werte werden nach geeigneten statistischen Verfahren, z. B. nach Nalimov [6], bei einer statistischen Sicherheit von 95 % eliminiert; Mittelwert und Standardabweichung werden aus den ausreißerfreien DR-Daten neu berechnet.

Das Endresultat wird dann mit der Gleichung [7] errechnet.

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \quad [7]$$

Darin sind:

$t_{n-1;\alpha}$  = Tabellenwert von t für n Wertepaare von E und  $E_0$  und einem statistischen Vertrauensbereich P ( $P = 1 - \alpha$ ), wobei P = 95 % gesetzt wird (1).

Als Ergebnis wird der Mittelwert mit Toleranzgrenzen bei einer statistischen Sicherheit von 95 %, die jeweilige Standardabweichung und die Anzahl an Daten der ausreißerfreien DR-Werte sowie die Anzahl der Ausreißer angegeben.

Beispiel:

DR = (98,6 ± 2,3 %) DOC-Abnahme,

s = 4,65 % DOC-Abnahme,

n = 18,

x = Anzahl der Ausreißer.

#### 2.2.2. Verfahren mit spezifischer Analyse

Die Eliminierung der Prüfsubstanz in % aus der wäßrigen Phase ( $R_w$ ) wird gemäß 1.2.2 berechnet.

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- das in Anlage 3 gegebene Formblatt mit den Betriebsbedingungen des Tests;
- die Angabe der verwendeten Anlage (OECD Confirmatory Test oder „Porous pot“);
- die Angabe der Verfahrensweise: gekoppelte oder nicht gekoppelte Anlagen;
- eine Beschreibung des Abwassers: künstliches oder kommunales Wasser; bei kommunalem Abwasser: Datum oder Ort der Probenahme;
- die Art des Inokulums; Datum und Ort der Probenahme;
- die Angabe und Beschreibung der Methoden, nach denen spezifische Analysen durchgeführt wurden;
- eine graphische Auftragung der CSB- und DOC-Abnahme gegen die Zeit während der Anlauf- und der Bewertungszeit;
- die analytische Wiederfindungsrate der Prüfsubstanz als CSB oder DOC in der Stammlösung;
- bei Durchführung spezifischer Analysen: graphische Auftragung der prozentualen Abnahme der Prüfsubstanz aus der wäßrigen Phase gegen die Zeit während der Anlauf- und Bewertungsphase;
- die mittlere Abnahme von DOC, CSB oder Prüfsubstanz und die Standardabweichungen aus den Ergebnissen während der Auswertungsphase, nachdem sich die Abnahme der Prüfsubstanz stabilisiert oder sich eine Periode stabiler Verhältnisse eingestellt hat;
- eine graphische Auftragung der Belebtschlammkonzentration gegen die Zeit;
- alle den Belebtschlamm betreffenden Manipulationen und Beobachtungen (Verwerfen von überschüssigem Schlamm, Eisen(III)chlorid usw.);
- die im Test eingesetzte Konzentration der Prüfsubstanz;
- alle Ergebnisse der Schlammanalysen;
- alle Informationen und Versuchsergebnisse über die Prüfsubstanz und — falls verwendet — über die Kontrollsubstanz;
- wissenschaftliche Begründung für alle etwaigen Verfahrensänderungen.

### 3.2. Interpretation der Ergebnisse

Ursache für eine geringe Abnahme der Prüfsubstanz in der wäßrigen Phase kann eine Hemmung der Mikroorganismen durch die Prüfsubstanz sein. Dies kann sich auch an einer Schlammauflösung und an einem Schlammverlust zeigen, was zu einem trüben Überstand sowie zu einer abnehmenden Effektivität der CSB- oder DOC-Abnahme in der Anlage führt.

Physikochemische Adsorption kann manchmal eine Rolle spielen. Zwischen biologischem Abbau des Moleküls und physikochemischer Adsorption kann unterschieden werden, wenn der Schlamm nach einer Desorption analysiert wird.

Soll zwischen vollständigem (oder teilweise) biologischen Abbau und Adsorption unterschieden werden, sind weitere Tests erforderlich. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an; am besten verwendet man jedoch den Überstand aus dem Absetzgefäß als Inokulum in einem Grundstufen-Test (vorzugsweise mit respiratorischer Messung).

Hohe DOC- oder CSB-Abnahmen werden in der Regel durch biologischen Abbau verursacht; bei geringer Abnahme kann dagegen nicht zwischen biologischem Abbau und Elimination und Adsorption unterschieden werden. Zeigt beispielsweise eine lösliche Verbindung eine hohe Adsorptionsrate von 98 % und werden täglich 10 % des Überschussschlammes entfernt, so ist allein hierdurch eine Elimination bis zu 40 % möglich. Werden täglich 30 % des Überschussschlammes entfernt, kann die Elimination aufgrund der Adsorption an und der Entfernung mit Überschussschlamm auf 65 % steigen (4).

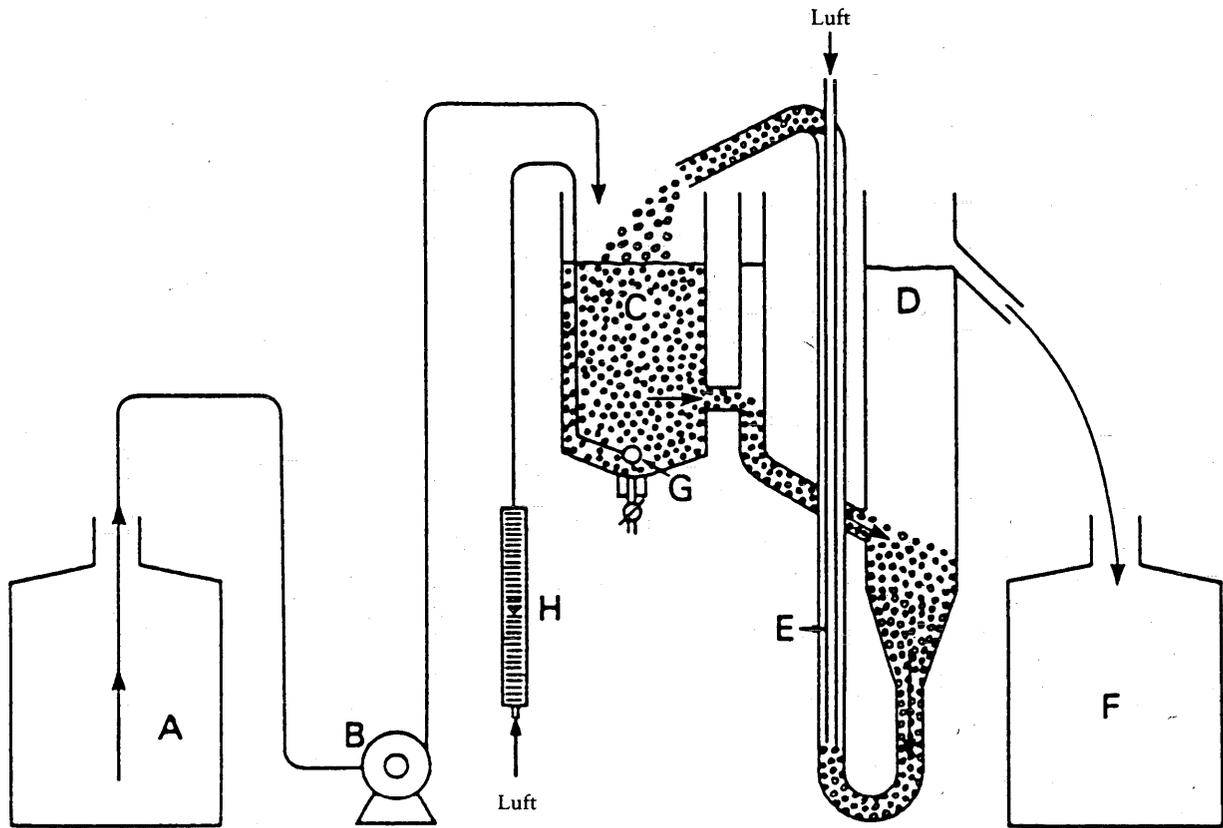
Bei spezifischen Analysen muß darauf geachtet werden, welche Bedeutung die Struktur der Substanz für die eingesetzte spezifische Analyse hat. Eine Abnahme der Substanz, bestimmt durch spezifische Analyse, kann nicht als Mineralisierung der Substanz interpretiert werden.

### 4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris 1981, *Test Guideline 303 A*, Beschluß des Rates C(81)30 final.
- (2) Anhang V; C 9; Abbaubarkeit — Chemischer Sauerstoffbedarf — Richtlinie der Kommission 84/449/EWG (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 251 von 1984).
- (3) H. A. Painter and E. F. King, *WRC Porous Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center, Vereinigtes Königreich.
- (4) Wierich P., and Gerike P., *The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Absorbing Compounds in Activated Sludge Plants — Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, Nr. 2 — June 1981, S. 161 bis 171.
- (5) Richtlinien 82/242/EWG und 82/243/EWG des Rates (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 109 vom 22. 4. 1982), zur Anpassung der Richtlinien 73/404/EWG und 73/405/EWG des Rates — *Biodegradability of detergents* — Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 347 vom 17. 12. 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980), S. 406 bis 408.

ANLAGE 1

Abbildung 1...



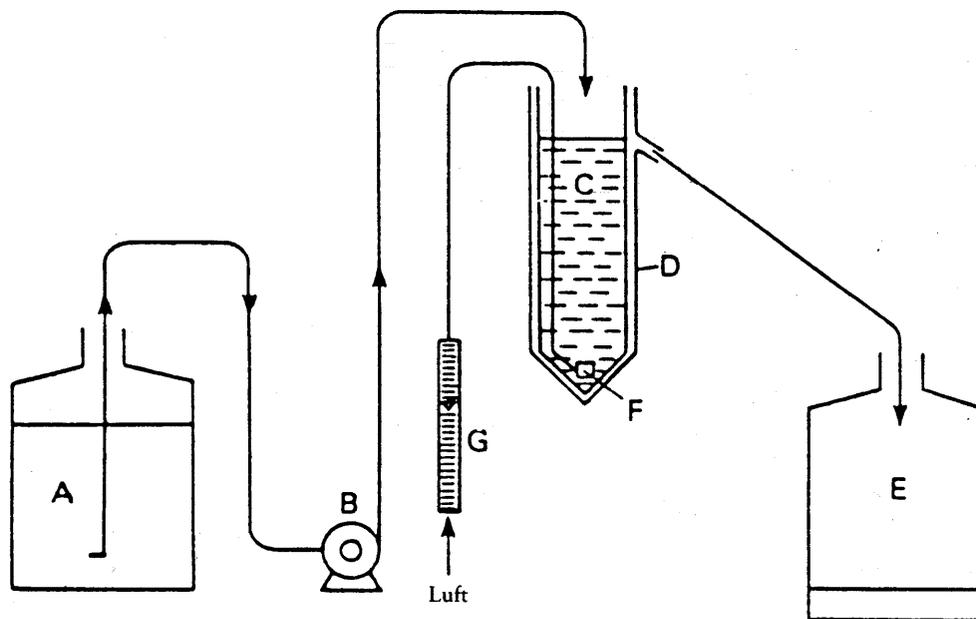
- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| A = Vorratsgefäß,                      | E = Druckluftheber,               |
| B = Dosiergerät,                       | F = Sammelgefäß,                  |
| C = Belüftungsgefäß (Volumen 3 Liter), | G = Verteiler,                    |
| D = Absetzgefäß,                       | H = Belüftungsmesser (wahlweise). |



ANLAGE 2

Abbildung 1

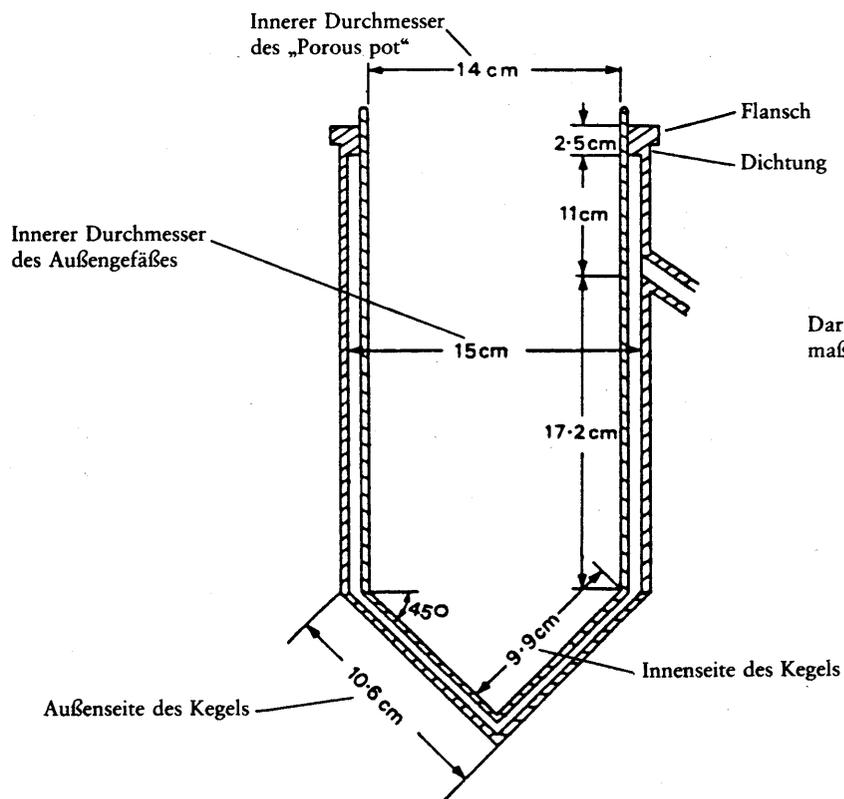
„Porous pot“-Anlage



- |                                 |                                   |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| A = Vorratsgefäß,               | E = Auffanggefäß,                 |
| B = Dosierpumpe,                | F = Lüftungsstein,                |
| C = Poren-Belüftungsgefäß,      | G = Belüftungsmesser (wahlweise). |
| D = undurchlässiges Außengefäß, |                                   |

Abbildung 2

Einzelheiten der 3-Liter-„Porous pot“-Belüftungseinheit



## Anlage 3

## Betriebsbedingungen des Simulationstests mit Belebtschlamm

In jeder Gruppe durchgeführte Kontrollen

*Anlage*OECD Confirmatory  
Porous Pot


*Betriebsweise*einzelne Anlage  
gekoppelte Anlage  
nicht gekoppelte Anlage


*Überimpfung*keine  
Belebtschlamm  
Überstand


*Mittlere Verweilzeit*3 Stunden  
6 Stunden


*Ausgangsnährmedium*kommunales Abwasser  
synthetisches Abwasser


*Inokulum*Kläranlagenablauf  
Mischinokulum  
Belebtschlamm


*Zugabe der Prüfsubstanz*bei Beginn  
schrittweiser Anstieg  
nach der Schlamm Bildung


*Analysen*spezifisch  
CSB  
DOC


## BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

## BELEBTSCHLAMM: PRÜFUNG DER ATMUNGSEHMUNG

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Die beschriebene Methode dient zur Bestimmung der Auswirkungen einer Prüfsubstanz auf Mikroorganismen durch Messen der Sauerstoffzehrung. Die Prüfung erfolgt unter festgelegten Bedingungen bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz.

Zweck dieser Methode ist die Schaffung eines schnellen Auswahlverfahrens, mit dem sich Substanzen feststellen lassen, die sich ungünstig auf Kläranlagen mit aeroben Mikroorganismen auswirken, sowie die Angabe geeigneter, nicht hemmender Konzentrationen von Prüfsubstanzen, die bei Prüfungen der biologischen Abbaubarkeit eingesetzt werden können.

Ein Vorversuch kann der eigentlichen Prüfung vorausgehen. Er liefert Informationen über den in der eigentlichen Prüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Die Versuchsdurchführung schließt zwei Kontrollen ohne Prüfsubstanzen ein, von denen die eine zu Beginn und die andere am Ende der Prüfreiheit durchgeführt wird. Jede Belebtschlammprobe ist außerdem mit Hilfe einer Referenzsubstanz zu überprüfen.

Dieses Verfahren ist am einfachsten bei Substanzen anzuwenden, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und geringen Flüchtigkeit voraussichtlich im Wasser verbleiben.

Für Substanzen mit begrenzter Löslichkeit im Prüfmedium kann der  $EC_{50}$ -Wert möglicherweise nicht bestimmt werden.

Wenn die Prüfsubstanz eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung bewirkt, können die auf der Sauerstoffaufnahme beruhenden Ergebnisse zu falschen Schlußfolgerungen führen.

Zur Durchführung der Prüfung sind folgende Informationen von Nutzen:

- Wasserlöslichkeit,
- Dampfdruck,
- Strukturformel,
- Reinheit der Prüfsubstanz.

*Empfehlung:*

Belebtschlamm kann pathogene Organismen enthalten und ist daher mit Vorsicht zu handhaben.

## 1.2. Definitionen und Einheiten

Als Sauerstoffzehrung wird der Sauerstoffverbrauch der im Belebtschlamm enthaltenen Mikroorganismen bezeichnet. Diese Zehrung wird im allgemeinen in  $mg\ O_2$  je  $mg$  Schlamm und Stunde ausgedrückt.

Zur Berechnung der Hemmwirkung einer Prüfsubstanz bei einer bestimmten Konzentration wird die Sauerstoffzehrung als Prozentsatz der Sauerstoffzehrung der gemittelten Werte der beiden Kontroll-Zehrungen ausgedrückt:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{Hemmung in Prozent}$$

Hierbei sind:

- $R_s$  = Sauerstoffzehrung bei der geprüften Konzentration der Prüfsubstanz,
- $RC_1$  = Sauerstoffzehrung der Kontrolle 1,
- $RC_2$  = Sauerstoffzehrung der Kontrolle 2.

Bei diesem Verfahren ist die  $EC_{50}$  die Konzentration der Prüfsubstanz, bei der die Sauerstoffzehrung 50 % der in der Kontrolle unter gleichen Bedingungen erreichten Zehrung ausmacht.

**1.3. Referenzsubstanzen**

Es wird empfohlen, 3,5-Dichlorphenol, das als Hemmstoff bekannt ist, als Referenzsubstanz zu verwenden und bei jeder einzelnen Belebtschlammprobe hiermit die  $EC_{50}$  zu prüfen, um eine anomale Empfindlichkeit des Schlammes festzustellen.

**1.4. Prinzip der Prüfmethode**

Die Sauerstoffzehrung eines Belebtschlammes, der mit einer genormten Menge synthetischen Abwassers beschickt wurde, wird nach Kontaktzeiten von 30 Minuten und/oder 3 Stunden gemessen. Ebenso wird die Sauerstoffzehrung desselben Belebtschlammes, dem jedoch unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zugesetzt wurden, gemessen. Die Hemmwirkung der Prüfsubstanz bei einer bestimmten Konzentration wird als Prozentsatz der durchschnittlichen Sauerstoffzehrung von zwei Kontrollen ausgedrückt. Aus Bestimmungen bei verschiedenen Konzentrationen wird die  $EC_{50}$  errechnet.

**1.5. Qualitätskriterien**

Die Prüfergebnisse sind gültig, sofern:

- die Sauerstoffzehrungen der beiden Kontrollen sich um höchstens 15 % voneinander unterscheiden;
- der  $EC_{50}$ -Wert (30 Minuten und/oder 3 Stunden) von 3,5-Dichlorphenol im zulässigen Bereich von 5 bis 30 mg/l liegt.

**1.6. Beschreibung der Prüfmethode****1.6.1. Reagenzien****1.6.1.1. Lösungen der Prüfsubstanz**

Die Lösungen der Prüfsubstanz werden aus einem Stammansatz zu Beginn jeder Untersuchung frisch zubereitet. Für das unten empfohlene Verfahren ist eine Konzentration von 0,5 g/l im Stammansatz geeignet.

**1.6.1.2. Lösung der Kontrollsubstanz**

Eine 3,5-Dichlorphenol-Lösung kann z. B. wie folgt zubereitet werden: 0,5 g 3,5-Dichlorphenol in 10 ml 1 M NaOH auflösen, mit destilliertem Wasser auf etwa 30 ml verdünnen, umrühren und gleichzeitig 0,5 M  $H_2SO_4$  bis zum Beginn der Ausfällung zugeben — hierzu sind etwa 8 ml erforderlich — und schließlich die Mischung mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert sollte dann etwa 7–8 betragen.

**1.6.1.3. Synthetisches Abwasser**

Synthetisches Abwasser wird durch Auflösen folgender Stoffmengen in einem Liter Wasser hergestellt:

- 16 g Pepton,
- 11 g Fleischextrakt,
- 3 g Harnstoff,
- 0,7 g NaCl,
- 0,4 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,
- 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,
- 2,8 g  $K_2HPO_4$ .

*Anmerkung 1:* Dieses synthetische Abwasser hat die hundertfache Konzentration des im technischen Bericht der OECD vom 11. Juni 1976: „Vorgeschlagenes Verfahren zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden in synthetischen Detergenzien“ beschriebenen Abwassers und enthält außerdem Dikaliumhydrogenphosphat.

*Anmerkung 2:* Wenn das vorbereitete synthetische Abwasser nicht sofort benutzt wird, wird es im Dunkeln bei 4 °C unter Bedingungen, die keine Veränderung seiner Zusammensetzung verursachen, für nicht länger als eine Woche aufbewahrt. Das synthetische Abwasser kann auch vor der Lagerung sterilisiert werden, oder Pepton und Fleischextrakt können kurz vor dem Versuchsansatz zugegeben werden. Es wird vor Gebrauch gründlich gemischt und der pH-Wert eingestellt.

**1.6.2. Geräte**

Meßanlage: Die Form der Anlage ist nicht entscheidend. Es darf jedoch kein Luftraum in der gefüllten Meßflasche sein, und die Sauerstoffelektrode muß genau in deren Hals passen.

Ergänzend zur normalen Laboratoriumsausstattung sind insbesondere folgende Geräte erforderlich:

- Meßanlage
- Belüftungseinrichtung
- pH-Elektrode
- $O_2$ -Elektrode.

1.6.3. *Vorbereitung des Inokulums*

Als Inokulum für die Prüfung wird Belebtschlamm aus einer vorwiegend kommunalen Kläranlage verwendet.

Falls notwendig, können grobe Teilchen daraus durch kurzzeitiges Absetzen, z. B. für 15 Minuten, und Dekantieren der oberen Schicht abgetrennt werden. Alternativ kann der Schlamm durch kurzzeitiges Mischen — einige Sekunden — mit einem Hochleistungsrührer homogenisiert werden. Zusätzlich sollte bei Verdacht auf Anwesenheit von Hemmstoffen der Schlamm mit Trinkwasser oder einer isotonischen Lösung gewaschen werden. Der Überstand wird nach Zentrifugation dekantiert. (Dieser Vorgang wird dreifach wiederholt.)

Eine kleine Menge des Schlammes wird gewogen und getrocknet. Daraus kann die Menge feuchten Schlammes berechnet werden, die in Wasser suspendiert werden muß, um einen Schlammgehalt zwischen 2 und 4 g/l einzustellen. Dies ergibt einen Schlammgehalt zwischen 0,8 und 1,6 g/l im Kulturmedium, wenn die unten vorgeschlagene Verfahrensweise befolgt wird.

Kann der Schlamm nicht am Tag der Entnahme verwendet werden, gibt man 50 ml synthetischen Abwassers zu jedem Liter des wie oben beschrieben zubereiteten Belebtschlammes hinzu. Diese Mischung wird dann bis zur Verwendung am nächsten Tag sowie während des Versuchs bei  $20 \pm 2$  °C belüftet. Vor der Verwendung wird der pH-Wert der Mischung geprüft und — falls erforderlich — mit Hilfe einer Natriumbikarbonatlösung auf einen pH-Wert von 6,0 bis 8,0 abgepuffert.

Die in der Flüssigkeit suspendierten Feststoffe sind nach dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren zu bestimmen.

Muß die gleiche Schlammprobe an aufeinanderfolgenden Tagen (höchstens 4 Tage) verwendet werden, gibt man weitere 50 ml synthetischen Abwassers pro Liter Schlamm am Ende jedes Arbeitstages hinzu.

1.6.4. *Durchführung der Prüfung*

Kontaktzeit/Dauer:	30 Minuten und/oder 3 Stunden unter ständiger Belüftung
Wasser:	Trinkwasser (entchlort, falls erforderlich)
Luftversorgung:	saubere, ölfreie Luft. Luftstrom: 0,5 bis 1 Liter/Minute
Meßanlage:	Gefäß mit flachem Boden, beispielsweise eine BSB-Flasche
Sauerstoffmeßgerät:	geeignete Sauerstoffelektrode mit Anzeige
Nährlösung:	synthetisches Abwasser (siehe oben)
Prüfsubstanz:	die Prüflösung wird zu Beginn der Prüfung frisch zubereitet
Referenzsubstanz:	beispielsweise 3,5-Dichlorphenol (mindestens 3 Konzentrationen)
Kontrollen:	beimpfter Ansatz ohne Prüfsubstanz
Temperatur:	$20 \pm 2$ °C.

Für eine dreistündige Kontaktzeit kann folgendes Versuchsverfahren sowohl für die Prüf- als auch für die Referenzsubstanz angewandt werden:

Es werden mehrere Gefäße (beispielsweise 1-Liter-Bechergläser) verwendet.

Es sind mindestens 5 Konzentrationen, die sich durch einen konstanten Faktor (möglichst nicht über 3,2) unterscheiden, zu verwenden.

Zum Zeitpunkt „0“ werden 16 ml des synthetischen Abwassers mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Dann werden 200 ml des Inokulums zugesetzt und die Gesamtmischung (500 ml) in das erste Gefäß gegeben (erste Kontrolle  $C_1$ ).

Die Versuchsgefäße sollten kontinuierlich belüftet werden, so daß sichergestellt ist, daß die Konzentration an gelöstem Sauerstoff 2,5 mg/l nicht unterschreitet und daß unmittelbar vor Messung der Sauerstoffzehrung die Sauerstoffkonzentration mindestens 6,5 mg/l beträgt.

Zum Zeitpunkt „15 Minuten“ (15 Minuten sind ein willkürliches, jedoch geeignetes Intervall) wird der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Diesmal werden jedoch 100 ml der Prüfsubstanz-Stammlösung zu den 16 ml synthetischen Abwassers zugegeben und anschließend mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Dann wird das Inokulum zugesetzt und das Volumen auf 500 ml aufgefüllt. Diese Mischung wird in das zweite Gefäß gegeben und wie oben beschrieben belüftet.

Dieser Vorgang wird in Abständen von 15 Minuten mit unterschiedlichen Mengen der Prüfsubstanz-Stammlösung wiederholt, um eine Reihe von Gefäßen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz zu erhalten. Schließlich wird eine zweite Kontrolle hergestellt ( $C_2$ ).

Nach drei Stunden wird der pH-Wert gemessen, dann eine gut gemischte Probe des Inhalts des ersten Gefäßes in die Meßanlage gegeben und die Sauerstoffzehrung über einen Zeitraum von höchstens 10 Minuten gemessen.

Diese Zehrungsmessung wird mit den Inhalten der einzelnen Gefäße in Intervallen von 15 Minuten durchgeführt, so daß die Kontaktzeit in jedem Gefäß drei Stunden beträgt.

Die Referenzsubstanz wird bei jeder Probe des Inokulums auf die gleiche Weise geprüft.

Ein geändertes Verfahren (beispielsweise mit mehr als einem Sauerstoffmeßgerät) ist erforderlich, falls die Messungen nach 30 Minuten Kontaktzeit durchgeführt werden sollen.

Ist eine Messung des chemischen Sauerstoffbedarfs erforderlich, werden weitere Gefäße mit Prüfsubstanz, synthetischem Abwasser und Wasser, jedoch ohne Belebtschlamm, vorbereitet. Der Sauerstoffbedarf wird nach einer Belüftungszeit von 30 Minuten und/oder drei Stunden Kontaktzeit gemessen und aufgezeichnet.

## 2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Sauerstoffzehrung wird aus der Aufzeichnung des Meßschreibers zwischen etwa 6,5 mg O<sub>2</sub>/l und 2,5 mg O<sub>2</sub>/l oder, bei niedriger Sauerstoffzehrung, über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen und als mg O<sub>2</sub>/l · h berechnet.

Der Teil der Zehrungskurve, bei dem die Zehrung gemessen wird, sollte linear sein.

Sofern die Sauerstoffzehrungen der beiden Kontrollen mehr als 15 % voneinander abweichen oder der EC<sub>50</sub>-Wert (30 Minuten und/oder 3 Stunden) der Referenzsubstanz nicht im gültigen Bereich liegt (5 bis 30 mg/l für 3,5-Dichlorphenol), ist die Prüfung ungültig und muß wiederholt werden.

Der Prozentsatz der Hemmung wird für jede Prüfkonzentration wie oben beschrieben berechnet, auf normalem Logarithmenpapier (oder Wahrscheinlichkeitspapier) gegen die Konzentration aufgetragen und der EC<sub>50</sub>-Wert hieraus ermittelt. 95 %-Vertrauensbereiche der EC<sub>50</sub>-Werte werden nach Standardverfahren ermittelt.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Prüfsubstanz: chemische Kenndaten;
- Prüfsystem: Herkunft, Konzentration sowie sämtliche Vorbehandlungen des Belebtschlammes.

Prüfbedingungen:

- pH der Kulturlösung vor der Zehrungsmessung;
  - Temperatur bei der Prüfung;
  - Dauer der Prüfung;
  - Referenzsubstanz und ihr gemessener EC<sub>50</sub>-Wert;
  - abiotische Sauerstoffzehrung (sofern diese auftritt).
- Ergebnisse
- sämtliche gemessenen Werte;
  - Hemmkurve und Verfahren zur Berechnung des EC<sub>50</sub>-wertes;
  - EC<sub>50</sub>-Wert und — falls möglich — EC<sub>20</sub>- und EC<sub>80</sub>-Werte mit 95 %-Vertrauensbereichen;
  - sämtliche Beobachtungen sowie Abweichungen von diesem Prüfverfahren, die möglicherweise das Ergebnis beeinflußt haben.

### 3.2. Interpretation der Werte

Der EC<sub>50</sub>-Wert sollte vornehmlich nur als Hinweis auf die mögliche Toxizität der Prüfsubstanz, entweder gegenüber dem Belebtschlamm bei der Abwasserbehandlung oder gegenüber Abwasser-Mikroorganismen, angesehen werden, da die in der Umwelt stattfindenden komplexen Wechselwirkungen bei einer Laboratoriumsprüfung nicht vollständig simuliert werden können.

Weiterhin können nitrifikationshemmende Substanzen atypische Hemmkurven verursachen. Solche Kurven sollten deshalb mit Vorsicht interpretiert werden.

## 4. LITERATUR

- (1) International Standard ISO 8192—1986
  - (2) Broecker, B. and Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, S. 165.
  - (3) Brown D., Hitz, H. R. and Schaefer L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).
  - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) *Recommended Method No. 103*, also Described by
  - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, (1976), S. 80.
  - (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, (1977), S. 247.
  - (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Beschluß des Rates C(81)30 endg.
-

## BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

## MODIFIZIERTER S.C.A.S-TEST

## 1. METHODE

## 1.1. Einleitung

Zweck des Verfahrens ist die Prüfung der potentiellen vollständigen biologischen Abbaubarkeit von wasserlöslichen, nichtflüchtigen organischen Stoffen, die längere Zeit relativ hohen Konzentrationen von Mikroorganismen ausgesetzt werden. Durch tägliche Zugabe von Abwasser als Nährlösung werden die Mikroorganismen während der Versuchszeit am Leben erhalten. An Wochenenden kann das Abwasser bei 4 °C aufbewahrt werden. Wahlweise kann auch das „synthetische“ Abwasser des OECD-Bestätigungstestes verwendet werden.

Tritt eine physikalisch-chemische Adsorption der Prüfsubstanz an die suspendierten Feststoffe auf, muß dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe Randziffer 3.2.). Wegen der langen Verweilzeit der flüssigen Phase in der Belüftungseinheit (36 Stunden) und der zwischenzeitlichen Zugabe von Nährstoffen simuliert der Test nicht die in einer Kläranlage üblichen Bedingungen. Die für verschiedene Prüfsubstanzen vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß das biologische Abbaupotential des Tests hoch ist.

Die Testbedingungen sind für die Selektion und/oder Adaptation von Mikroorganismen, die die Prüfsubstanzen abzubauen vermögen, äußerst günstig.

(Dieses Verfahren kann auch zur Herstellung akklimatisierten Impfgutes für andere Prüfungen angewandt werden.)

Bei dieser Methode wird die Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) als Maß zur Beurteilung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit der Prüfsubstanz benutzt. Der Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff ist vorzugsweise nach Ansäuerung und Strippen und *nicht* als Differenz zwischen Gesamtkohlenstoffgehalt und anorganischem Kohlenstoff zu bestimmen.

Werden gleichzeitig spezifische Analysen durchgeführt, kann der Primärabbau (Verschwinden der chemischen Ausgangsstruktur) des Stoffes beurteilt werden.

Mit diesem Verfahren können nur organische Stoffe geprüft werden, die bei der verwendeten Konzentration

- in Wasser löslich sind (mindestens 20 mg DOC/L);
- einen niederen Dampfdruck aufweisen;
- die Bakterien nicht hemmen;
- innerhalb des Prüfsystems nicht nennenswert adsorbieren;
- nicht durch Schäumen aus der Testlösung verlorengehen.

Der organische Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz ist zu bestimmen.

Informationen über die relativen Anteile der Hauptkomponenten der Prüfsubstanz sind für die Interpretation der Ergebnisse insbesondere dann nützlich, wenn niedrige oder marginale Abbau-Werte erhalten werden.

Informationen über die Toxizität des Stoffes gegenüber Mikroorganismen sind zur Interpretation niedriger Abbauwerte sowie zur Auswahl geeigneter Prüfkonzentrationen nützlich.

## 1.2. Definitionen und Einheiten

$C_T$  = Konzentration der Prüfsubstanz, bestimmt als zu Beginn der Belüftungszeit vorhandener oder hinzugegebener organischer Kohlenstoff (mg/L);

$C_t$  = Konzentration des organischen Kohlenstoffs in der nach Belüftung und anschließender Sedimentation überstehenden Flüssigkeit in der Prüfeinheit (mg/L);

$C_c$  = Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs in der nach Belüftung und anschließender Sedimentation überstehenden Flüssigkeit der Kontrolleinheit (mg/L).

Der biologische Abbau wird in dieser Vorschrift als Abnahme des Gehalts an organischem Kohlenstoff definiert. Er läßt sich wie folgt darstellen:

1. als prozentuale Abnahme  $D_{da}$  der täglich hinzugegebenen Stoffmenge:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

$D_{da}$  = Abbau/Tägliche Zugabe.

2. Als prozentuale Abnahme  $D_{ssd}$  der zu Beginn eines jeden Tages im Testsystem vorhandenen Stoffmenge:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 b)]$$

$D_{ssd}$  = Abbau/Stoff zu Beginn des Tages.

Die Indizes  $i$  und  $(i + 1)$  beziehen sich auf den Tag der Messung. Gleichung 2a) wird empfohlen, wenn der DOC-Gehalt der entnommenen Kultursuspension täglichen Schwankungen unterworfen ist, während Gleichung 2b) benutzt werden kann, wenn der DOC-Gehalt von Tag zu Tag relativ konstant bleibt.

### 1.3. Referenzsubstanzen

Bei der Untersuchung neuer Stoffe können in einigen Fällen Referenzsubstanzen nützlich sein; jedoch können keine spezifischen Substanzen empfohlen werden.

In Anlage 1 werden Daten von mehreren Verbindungen, die in Ringversuchen geprüft worden sind, angegeben. Mit ihnen kann gelegentlich eine Kalibrierung der Methode vorgenommen sowie ein Vergleich mit Ergebnissen, die mit anderen Methoden erhalten wurden, durchgeführt werden.

### 1.4. Prinzip der Methode

Belebtschlamm aus einer Kläranlage wird in eine Belüftungseinheit, die halbkontinuierlich betrieben wird (Semi-Continuous Activated Sludge unit, SCAS-Einheit), gegeben. Die Prüfsubstanz sowie häusliches Abwasser werden zugesetzt und das Gemisch 23 Stunden lang belüftet. Danach läßt man den Schlamm absetzen und nimmt die überstehende Flüssigkeit ab.

Der im Kulturgefäß verbleibende Schlamm wird sodann mit einer weiteren aliquoten Menge der Prüfsubstanz sowie mit Abwasser gemischt und das Verfahren wird wiederholt.

Der biologische Abbau wird durch Bestimmung des DOC-Gehalts nach Sedimentation des Schlammes in der überstehenden Flüssigkeit ermittelt. Dieser Wert wird mit dem entsprechenden der Kontrolleinheit verglichen.

Wird ein spezifisches Analyseverfahren angewandt, so können Veränderungen in der Konzentration der Ausgangsverbindung, die infolge des biologischen Abbaus (Primär-Abbau) auftreten, gemessen werden.

### 1.5. Qualitätskriterien

Die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens, das auf der Messung der DOC-Abnahme beruht, ist noch nicht überprüft worden. (Ist der biologische Primär-Abbau zu ermitteln, so können sehr präzise Daten für Stoffe erhalten werden, die weitgehend abgebaut werden.)

Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist weitgehend von den Schwankungen des Kontrollwerts und in geringerem Ausmaß von der Genauigkeit der Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs und der Konzentration der Prüfsubstanz in der Kultursuspension zu Beginn der einzelnen Zyklen abhängig.

### 1.6. Prüfverfahren

#### 1.6.1. Vorbereitung

Eine ausreichende Zahl von sauberen Kulturgefäßen (wahlweise kann auch die ursprüngliche SCAS-Einheit, die ein Volumen von 1,5 l faßt, angewandt werden) und Belüftungsröhen für jede Prüfsubstanz sowie die Kontrolle werden zusammengesetzt. Die den Prüfeinheiten zugeführte Druckluft muß, durch ein Wattefilter gereinigt, frei von organischem Kohlenstoff sein und zur Verminderung der Evaporationsverluste zuvor mit Wasser gesättigt werden.

Eine Mischprobe mit 1 bis 4 g suspendierten Feststoffen/l wird einer Belebtschlammanlage, in der vorwiegend häusliche Abwässer behandelt werden, entnommen.

Für jede Belüftungseinheit sind rund 150 ml Belebtschlamm erforderlich.

Stammlösungen der Prüfsubstanz werden in destilliertem Wasser zubereitet; normalerweise ist eine Konzentration von 400 mg organischen Kohlenstoffs/l erforderlich, um eine Konzentration der Prüfsubstanz von 20 mg Kohlenstoff/l zu Beginn jedes Belüftungszyklus, wenn kein biologischer Abbau erfolgt, einzustellen.

Höhere Konzentrationen sind zulässig, wenn die Toxizität gegenüber den Mikroorganismen dies erlaubt. Der Gehalt der Stammlösungen an organischem Kohlenstoff wird gemessen.

#### 1.6.2. *Prüfbedingungen*

Der Test ist bei einer Temperatur von 20 bis 25 °C durchzuführen. Es wird eine hohe Konzentration aerober Mikroorganismen verwendet (1 bis 4 g/l suspendierte Feststoffe); die effektive Verweilzeit im Kulturgefäß beträgt 36 Stunden. Die kohlenstoffhaltigen Substanzen im zugesetzten Abwasser werden in der Regel innerhalb der ersten acht Stunden nach Beginn eines jeden Belüftungszyklus weitestgehend oxydiert. Danach atmet der Schlamm endogen; während dieser Zeit ist die Prüfsubstanz das einzig verfügbare Substrat, wenn sie nicht ebenfalls sofort abgebaut worden ist. Diese Rahmenbedingungen schaffen, zusammen mit der täglichen Wiederbeimpfung bei Verwendung von häuslichem Abwasser als Nährmedium, sowohl für die Akklimatisierung als auch für einen weitgehenden biologischen Abbau sehr günstige Voraussetzungen.

#### 1.6.3. *Durchführung der Prüfung*

Eine gemischte Belebtschlamm-Probe wird einer geeigneten kommunalen Kläranlage, die vorwiegend häusliche Abwässer behandelt, oder einer Laboratoriumsanlage entnommen und bis zur Verwendung im Laboratorium unter aeroben Bedingungen gehalten. In jede Prüf- und Kontrolleinheit werden 150 ml (werden die Original-SCAS-Prüfeinheiten verwendet, so sind die angegebenen Volumina zu verzehnfachen) der Belebtschlamm-Suspension gegeben und dann belüftet. Nach 23 Stunden wird die Belüftung ausgeschaltet und man läßt den Schlamm 45 Minuten absetzen. Dann werden die Ablaufstutzen der einzelnen Gefäße geöffnet und aus jedem 100 ml der überstehenden Flüssigkeit entnommen. Von einer unmittelbar vor Gebrauch gezogenen Probe häuslicher Abwässer, aus dem die gröberen Partikel nach Sedimentation entfernt wurden, werden je 100 ml zu dem in den Belüftungseinheiten verbliebenen Schlamm gegeben. Sodann wird wieder belüftet. In dieser Phase werden keine Prüfsubstanzen zugesetzt. In die Einheiten wird so oft häusliches Abwasser gegeben, bis nach dem Absetzen des Schlammes eine klare überstehende Flüssigkeit erhalten wird. Dies dauert in der Regel bis zu zwei Wochen; in dieser Zeit nähert sich der gelöste organische Kohlenstoff in der überstehenden Schicht nach Abschluß der Belüftungszyklen einem konstanten Wert.

Am Ende dieser Phase werden die einzelnen abgesetzten Schlämme gemischt und jeweils 50 ml des daraus erhaltenen Mischschlammes wiederum in die einzelnen Einheiten gegeben.

95 ml abgesetztes Abwasser und 5 ml Wasser werden in den Kontrollansatz und 95 ml des abgesetzten Abwassers und 5 ml der Prüfsubstanz-Stammlösung (400 mg/l) werden in jede Prüfeinheit gegeben. Dann wird wieder für 23 Stunden belüftet. Danach läßt man den Schlamm 45 Minuten absetzen, worauf die überstehende Schicht abgenommen und auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff untersucht wird.

Das oben beschriebene Füll- und Entnahmeverfahren wird während der Testdauer täglich wiederholt.

Vor dem Absetzen müssen eventuell die Wände der Einheiten gereinigt werden, um eine Anhaftung von Feststoffen oberhalb des Flüssigkeitsniveaus zu verhindern. Für jede Einheit sind getrennte Schaber oder Bürsten zu verwenden, um eine gegenseitige Kontamination zu vermeiden.

Im Idealfall wird der Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff in der überstehenden Kultursuspension täglich bestimmt; weniger häufige Analysen sind jedoch zulässig. Vor der Analyse werden die Suspensionen durch gewaschene Membranfilter von 0,45 µm filtriert oder zentrifugiert. Membranfilter sind geeignet, wenn sichergestellt ist, daß sie weder Kohlenstoff freisetzen noch Stoffe bei der Filtration adsorbieren. Die Temperatur der Probe darf bei der Zentrifugation 40 °C nicht übersteigen.

Die Dauer der Prüfung ist für gering oder nicht biologisch abbaubare Verbindungen unbestimmt; nach bisherigen Erfahrungen sollte sie mindestens 12, höchstens jedoch 26 Wochen betragen.

## 2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Gehalte an gelöstem organischen Kohlenstoff in den nach der Sedimentation überstehenden Kultursuspensionen der Prüf- und Kontrolleinheiten werden gegen die Zeit graphisch aufgetragen.

Nach Abschluß des biologischen Abbaus sollten sich die Werte der Prüfansätze demjenigen des Kontrollansatzes nähern. Bleibt die Differenz zwischen diesen beiden Werten während drei aufeinanderfolgender Messungen konstant, so werden noch so viele Messungen vorgenommen, wie es zur statistischen Auswertung der Daten erforderlich ist, und der prozentuale biologische Abbau der zu prüfenden Substanz wird berechnet ( $D_{da}$  oder  $D_{ssd}$ , siehe Randziffer 1.2.).

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- sämtliche Informationen über die Art des Abwassers, den Typ der benutzten Belüftungseinheit und die mit dem zu prüfenden Stoff, der Kontrolle sowie gegebenenfalls mit der Referenzsubstanz erhaltenen Versuchsergebnisse;
- Temperatur;
- Abbaukurve mit Beschreibung der Berechnungsweise (siehe Randziffer 1.2);
- Datum und Ort der Entnahme des Belebtschlammes und des Abwassers;
- Stand der Adaptation, Konzentration usw.;
- wissenschaftliche Gründe für jedwede Änderung des Prüfverfahrens;
- Unterschrift und Datum.

#### 3.2. Interpretation der Ergebnisse

Da der mit diesem Verfahren zu prüfende Stoff biologisch nicht leicht abbaubar ist, wird jede ausschließlich auf biologischen Abbau zurückzuführende Abnahme des DOC-Gehalts in der Regel über Tage oder Wochen nur langsam erfolgen. Ausgenommen sind die Fälle, in denen eine plötzliche Akklimatisierung eintritt, erkennbar an einer raschen DOC-Abnahme.

Eine physikalisch-chemische Adsorption kann jedoch oftmals eine wichtige Rolle spielen; dies ist daran erkenntlich, daß der zugesetzte gelöste organische Kohlenstoff von Anfang an vollständig oder teilweise verschwindet. Die danach auftretenden Effekte sind von Faktoren wie dem Adsorptionsgrad und der Konzentration der suspendierten Partikel in der den Belüftungseinheiten entnommenen Suspension abhängig. Die Differenz zwischen den DOC-Konzentrationen in der Kontrolle und dem Prüfansatz nimmt zunächst in der Regel von geringen Anfangswerten fortschreitend zu und bleibt dann während der restlichen Versuchszeit konstant, sofern keine Akklimatisierung erfolgt.

Soll zwischen vollständigem (oder teilweise) biologischem Abbau und Adsorption unterschieden werden, sind weitere Tests erforderlich. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an; am besten verwendet man jedoch den Belebtschlamm aus der Prüfeinheit oder die nach Sedimentation daraus erhaltene Kultursuspension als Inokulum in einem Grundstufen-Test (vorzugsweise respirometrisch).

Prüfsubstanzen, die eine weitgehende, nicht durch Adsorption bedingte Abnahme des DOC-Gehalts in diesem Test aufweisen, sind als potentiell biologisch abbaubar zu betrachten. Eine partielle nichtadsorptive Abnahme weist darauf hin, daß der Stoff zumindest teilweise biologisch abbaubar ist.

Erfolgt keine oder nur eine geringe Abnahme des gelösten organischen Kohlenstoffs, kann dies möglicherweise auf einer Hemmung der Mikroorganismen durch den zu prüfenden Stoff beruhen. Diese kann sich auch durch Auflösung und Verlust des Schlammes sowie einer Trübung der überstehenden Kultursuspension zeigen. In solchen Fällen ist die Prüfung mit einer niedrigeren Konzentration des zu prüfenden Stoffes zu wiederholen.

Durch spezifische Analysemethoden oder den Einsatz <sup>14</sup>C-markierter Prüfsubstanzen läßt sich eventuell eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Wird <sup>14</sup>C-markierte Prüfsubstanz verwendet, läßt sich durch Nachweis des entstehenden <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> bestätigen, daß ein biologischer Abbau stattgefunden hat.

Werden die Ergebnisse auch in Form des biologischen Primär-Abbaus angegeben, so sollten, wenn möglich, Angaben über die Veränderungen der chemischen Struktur gemacht werden, die die mangelnde Wiederauffindung der Ausgangssubstanz begründen.

Die Validierung der Analysemethode sowie die damit bestimmten Werte im Nährmedium ohne Zusatz der Prüfsubstanz müssen angegeben werden.

### 4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Beschluß des Rates C(81)30 endg.

## Anlage 1

## S.C.A.S.-Test: Beispiel der Ergebniseingabe

Substanz	$C_T$ (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Prozent biologischer Abbau $D_{da}$	Testdauer (Tage)
4-Acetylamino-Benzolsulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropylbenzolsulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-Nitrophenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentantetracarboxylat	17,9	3,2	81,1	120

## ANLAGE 2

## Beispiel der Testapparatur

Abbildung 1

