

C.37. 21-Tage Fisch-Screening-Assay: Ein Kurzzeittest zur Bestimmung der östrogenen und androgenen Aktivität und der Aromatasehemmung

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 230 (2009). Die Entwicklung und Validierung eines Fischtests, mit dem bestimmte endokrin aktive Chemikalien nachgewiesen können, geht die Befürchtung zurück, dass in der Umwelt vorhandene Chemikalien aufgrund ihrer Interaktion mit dem endokrinen System die Gesundheit von Mensch, Fauna und Flora gefährden. 1998 hat die OECD vorrangig mit der Änderung bestehender und der Entwicklung neuer Leitlinien für *Screening*-Tests und die Untersuchung potenziell endokriner Disruptoren begonnen. Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer technischen Leitlinie für das Screening von Chemikalien mit Wirkung auf das endokrine System von Fischen. Der 21-Tage-Fisch-Screening-Assay wurde im Rahmen laborübergreifender Untersuchungen an ausgewählten Chemikalien umfassend validiert, um die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Assay für den Nachweis östrogen wirksamer und aromatasehemmender Chemikalien (1)(2)(3)(4)(5) bei den drei untersuchten Fischarten (Dickkopfelritze, Japanischer Reiskärpfling und Zebraäbrbling) zu demonstrieren. Bei Dickkopfelritzen und bei Japanischen Reiskärpflingen kann androgene Aktivität nachgewiesen werden, nicht aber bei Zebraäbrblingen. Anti-androgen wirkende Chemikalien können mit dieser Prüfmethode nicht nachgewiesen werden. Die Validierungsarbeit wurde von einer Gruppe von Experten, die von den nationalen Koordinatoren des Prüfrichtlinien-Programms ernannt wurden, einer *Peer-Review* unterzogen (6). Der Test ist nicht dazu bestimmt, bestimmte hormonale Disruptoren zu ermitteln, weil die Prüffische eine intakte Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse) besitzen, die auf unterschiedlichen Ebenen auf Chemikalien, die auf die HHG-Achse einwirken, reagieren kann. Der Kurzzeit-Reproduktionstest an Fischen (*Fish Short Term Reproduction Assay*, FSTRA) (OECD TG 229) umfasst Fruchtbarkeits- und gegebenenfalls histopathologische Gonaden-Untersuchungen bei Dickkopfelritzen sowie sämtlicher unter diese Prüfmethode fallenden Endpunkte. Die OECD-Prüfrichtlinie TG 229 sieht ein Screening von Chemikalien vor, die die Reproduktion durch unterschiedliche Mechanismen (u. a. durch endokrine Prozesse) beeinflussen. Dem sollte Rechnung getragen werden, bevor über die geeignetste Prüfmethode entschieden wird.
2. Die vorliegende Prüfmethode entspricht einem *In-vivo*-Screening-Assay, bei dem geschlechtsreife männliche und weibliche Fische gemeinsam gehalten und für einen begrenzten Teil ihres Lebenszyklus (21 Tage) einer Chemikalie ausgesetzt werden. Nach dieser 21-tägigen Exposition werden je nach verwendeter Art bei männlichen und weiblichen Fischen ein oder zwei Biomarker-Endpunkte als Indikatoren einer östrogenen, aromatasehemmenden oder androgenen Wirkung der Prüfchemikalie gemessen. Diese Endpunkte sind Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale. Vitellogenin wird bei Dickkopfelritzen, bei Japanischen Reiskärpflingen und bei Zebraäbrblingen gemessen, die sekundären Geschlechtsmerkmale hingegen nur bei Dickkopfelritzen und Japanischen Reiskärpflingen.

3. Dieser Bioassay dient dem *In-vivo*-Screening bestimmter endokriner Wirkungsweisen und ist im Zusammenhang mit dem „*OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*“ (28) zu sehen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Vitellogenin (VTG) wird gewöhnlich von der Leber weiblicher oviparer Vertebraten in Reaktion auf im Blutkreislauf zirkulierendes endogenes Östrogen produziert. VTG ist ein Vorläufer von Eidotterproteinen und wandert, einmal in der Leber produziert, über die Blutbahn zum Eierstock, wo es aufgenommen und von sich entwickelnden Eiern modifiziert wird. Vitellogenin ist im Plasma noch nicht geschlechtsreifer weiblicher und männlicher Fische kaum nachweisbar, da sich bei diesen noch nicht genügend zirkulierendes Östrogen gebildet hat. Die Leber kann Vitellogenin jedoch in Reaktion auf eine exogene Östrogenstimulation synthetisieren und absondern.
5. Die Messung der VTG-Konzentration ermöglicht den Nachweis von Chemikalien mit unterschiedlichen östrogenen Wirkungsweisen. Östrogen wirksame Chemikalien können durch Messung der VTG-Induktion bei männlichen Fischen nachgewiesen werden, was in wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit Peer Review umfassend dokumentiert wurde (z. B. (7)). VTG-Induktion wurde auch nach Exposition gegenüber aromatisierbaren Androgenen nachgewiesen (8)(9). Eine Reduktion des im Körper weiblicher Tiere zirkulierenden Östrogens, beispielsweise durch Hemmung der Aromatase, die endogenes Androgen in das natürliche Östrogen 17 β -Östradiol umwandelt, bewirkt eine Verringerung der VTG-Konzentration, die zum Nachweis von Chemikalien mit aromatasehemmenden Eigenschaften verwendet wird (10)(11). Die biologische Relevanz der VTG-Reaktion nach einer Östrogen-/Aromatasehemmung ist erwiesen und wurde umfassend dokumentiert. Die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren kann aber auch durch allgemeine Toxizität und nicht endokrine toxische Wirkungen (z. B. Hepatotoxizität) beeinflusst werden.
6. Für Routinemessungen haben sich verschiedene standardisierte Verfahren bewährt, so der artspezifische ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), bei dem das in kleinen Blut- oder Leberproben einzelner Fische produzierte Vitellogenin immundiagnostisch quantifiziert wird (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18). Die VTG-Messungen werden an Blutproben und/oder Kopf-/Schwanz-Homogenaten von Dickkopfelritzen und Zebraabärblingen sowie an Leberproben Japanischer Reiskärpflinge vorgenommen. Bei Japanischen Reiskärpflingen besteht eine ausgeprägte Korrelation zwischen dem im Blut und in der Leber gemessenen VTG (19). Anlage 6 enthält Empfehlungen für Verfahren zur Entnahme von Proben für Vitellogenin-Analysen. Kits für Vitellogenin-Messungen sind allgemein erhältlich; sie sollten auf einem validierten artspezifischen ELISA beruhen.
7. Sekundäre Geschlechtsmerkmale männlicher Fische bestimmter Arten sind äußerlich sichtbar und quantifizierbar und reagieren auf zirkulierende Mengen endogen wirkender Androgene. Dies gilt für Dickkopfelritzen und für Japanische Reiskärpflinge, nicht aber für Zebraabärblinge, die keine quantifizierbaren sekundären Geschlechtsmerkmale besitzen. Weibliche Tiere behalten die Fähigkeit bei, sekundäre männliche Geschlechtsmerkmale zu entwickeln, wenn sie in Wasser androgen

wirksamen Chemikalien ausgesetzt werden. In der Literatur wird auf mehrere Studien hingewiesen, die diese Art von Reaktion bei Dickkopfelritzen (20) und Japanischen Reiskärpflingen (21) belegen. Ein Rückgang sekundärer Geschlechtsmerkmale bei männlichen Fischen sollte aufgrund der geringen statistischen Aussagekraft mit Vorsicht interpretiert werden; jede Wertung sollte sich auf Expertenurteile und die Beweiskraft der Daten stützen. Zebrabärblinge sind für diesen Test nur begrenzt geeignet, da quantifizierbare sekundäre Geschlechtsmerkmale fehlen, die auf androgen wirksame Chemikalien reagieren könnten.

8. Bei Dickkopfelritzen ist der Laichausschlag am Maul weiblicher Fische Hauptindikator einer exogenen Androgenexposition. Wichtigster Marker einer exogenen Exposition gegenüber androgen wirkenden Chemikalien bei weiblichen Japanischen Reiskärpflingen ist die Zahl der Papillenprozesse. Die Anlagen 5A und 5B enthalten Empfehlungen für Verfahren zur Bewertung von Geschlechtsmerkmalen bei Dickkopfelritzen bzw. Japanischen Reiskärpflingen.
9. Für Begriffsbestimmungen zu dieser Prüfmethode siehe Anlage 1.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Beim Assay werden geschlechtsreife männliche und weibliche Fische in Prüfgefäßen gemeinsam einer Prüfchemikalie ausgesetzt. Da die Tiere ausgewachsen und geschlechtsreif sind, kann leicht zwischen den Geschlechtern unterschieden und folglich eine geschlechtsspezifische Analyse der einzelnen Endpunkte vorgenommen werden, und Sensitivität gegenüber exogenen Chemikalien ist gewährleistet. Bei Testende wird das Geschlecht der Fische durch makroskopische Untersuchung der Gonaden nach bauchseitiger Öffnung des Abdomens mit einer Schere bestimmt. Anlage 2 fasst die wichtigsten Bedingungen des Bioassays zusammen. Der Test wird gewöhnlich mit einer Fischstichprobe aus einer Laichpopulation begonnen; seneszente Tiere sollten nicht verwendet werden. Der Abschnitt über die Auswahl der Fische enthält Hinweise zum Alter und zur Geschlechtsreife der Fische. Der Test wird mit drei Konzentrationen der Prüfchemikalie und einer Wasserkontrolle sowie erforderlichenfalls einer Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Bei Japanischen Reiskärpflingen und bei Zebrabärblingen werden je Konzentration zwei Gefäße oder Replikate verwendet (jedes Gefäß mit fünf männlichen und fünf weiblichen Fischen); bei Dickkopfelritzen sind je Konzentration vier Gefäße oder Replikate zu verwenden (jedes Gefäß mit zwei männlichen und vier weiblichen Fischen), um dem Territorialverhalten männlicher Dickkopfelritzen Rechnung zu tragen und gleichzeitig hinreichende Aussagekraft zu gewährleisten. Die Exposition erfolgt über einen Zeitraum von 21 Tagen; die Fische werden an Tag 21 nach Beginn der Exposition im Stichprobenverfahren untersucht.
11. Am Tag der Stichprobenuntersuchung (Tag 21) sind alle Tiere möglichst schmerzfrei zu töten. Bei Dickkopfelritzen und Japanischen Reiskärpflingen werden sekundäre Geschlechtsmerkmale gemessen (siehe Anlagen 5A und 5B). Zur Bestimmung der VTG-Konzentration werden von Zebrabärblingen und Dickkopfelritzen Blutproben entnommen; alternativ kann die VTG-Konzentration bei Zebrabärblingen auch anhand von Kopf- und Schwanzproben ermittelt werden (Anlage 6); bei Japanischen

Reiskörpflinge werden zur VTG-Analyse Leberproben entnommen (Anlage 6).

GÜLTIGKEITSKRITERIEN

12. Die Testergebnisse sind gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Die Mortalität in den Wasser- (oder Lösungsmittel-)kontrollen darf am Ende der Exposition höchstens 10 % betragen;
- die Konzentration an gelöstem Sauerstoff sollte während der gesamten Exposition mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;
- die Wassertemperatur der Prüfgefäße sollte während der Exposition zu keinem Zeitpunkt um mehr als $\pm 1,5$ °C schwanken und bei einer Toleranz von 2 °C in dem Temperaturbereich liegen, der für die Testspezies vorgesehen ist (Anlage 2);
- es muss erwiesen sein, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 20 % bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

13. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

- a) Sauerstoff- und pH-Messgeräte;
- b) Geräte zur Messung von Wasserhärte und Alkalität;
- c) geeignete Apparaturen zur Temperaturregelung und einer möglichst kontinuierlichen Überwachung;
- d) Becken aus chemisch inertem Material und mit für das empfohlene Besatzverhältnis und die empfohlene Besatzdichte geeignetem Fassungsvermögen (siehe Anlage 2);
- e) Laichsubstrat für Dickkopfelritzen und Zebraabräblinge (für Einzelheiten siehe Anlage 4);
- f) eine Waage mit angemessener Genauigkeit ($\pm 0,5$ mg).

Wasser

14. Als Testwasser kann jedes beliebige Wasser verwendet werden, in dem die Testspezies über einen längeren Zeitraum überleben und wachsen können. Während der gesamten Testdauer sollte eine konstante Wasserqualität gewährleistet sein. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5-8,5 liegen, kann jedoch im Test um $\pm 0,5$ pH-Einheiten schwanken. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Testergebnis nicht übermäßig stark beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfchemikalie), sind regelmäßig Proben zu analysieren. Das Wasser ist auf

Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- und SO_4^{2-}), Pestizide (z. B. den Gesamtgehalt an phosphororganischen und chlororganischen Pestiziden), den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen (beispielsweise alle drei Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist). Ist die Wasserqualität nachweislich mindestens ein Jahr lang konstant geblieben, so können die Analysen seltener durchgeführt und die Abstände zwischen den Analysen verlängert werden (beispielsweise auf sechs Monate). Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 3 gegeben.

Testlösungen

15. Die Testlösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte möglichst durch einfaches mechanisches Vermischen oder Schütteln (z. B. durch Rühren oder mit Ultraschall) der Prüfchemikalie in Verdünnungswasser hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen (Löslichkeitssäulen) verwendet werden. Die Verwendung von Lösungsmittelträgern wird nicht empfohlen. Ist jedoch ein Lösungsmittel erforderlich, so sollte zeitgleich in derselben Lösungsmittelkonzentration wie bei der chemischen Behandlung eine Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. Bei schwierigen Prüfchemikalien kann die Verwendung eines Lösungsmittels aus technischer Sicht die beste Lösung darstellen (siehe *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (22). Welches Lösungsmittel zu verwenden ist, hängt von den chemischen Eigenschaften der Chemikalie ab. Der OECD-Leitfaden empfiehlt höchstens 100 µl/l; dieser Wert sollte eingehalten werden. In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung (23) wurde jedoch auf weitere Bedenken hinsichtlich der Verwendung von Lösungsmitteln in Tests zur Prüfung endokriner Wirkungen verwiesen. Daher sollte die Lösungsmittelkonzentration (wenn überhaupt ein Lösungsmittel verwendet werden muss) so weit wie technisch möglich minimiert werden (je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie).
16. Für den Test ist ein Durchflusssystem zu verwenden. Ein solches System gibt kontinuierlich eine Stammlösung der Prüfchemikalie ab und verdünnt diese (z. B. mit einer Dosierpumpe, einem Proportionalverdünner oder einer Sättigungsvorrichtung), damit unterschiedliche Konzentrationen in die Prüfkammern gelangen. Die Durchflussraten von Stammlösungen und Verdünnungswasser sind während des Tests regelmäßig – vorzugsweise täglich – zu kontrollieren und dürfen während des Tests um höchstens 10 % schwanken. Insbesondere sind Kunststoffleitungen aus minderwertigem Material oder sonstige Materialien zu vermeiden, die biologisch aktive Chemikalien enthalten könnten. Bei der Auswahl des Materials für das Durchflusssystem ist eine mögliche Adsorption der Prüfchemikalie an das Material zu berücksichtigen.

Halten der Fische

17. Die Testfische sollten aus einer Laborpopulation stammen, vorzugsweise aus einer einzigen Population, die mindestens zwei Wochen vor dem Test unter bei ähnlicher Wasserqualität und ähnlichen Lichtverhältnissen wie im Test akklimatisiert wurde.

Besatz(verhältnis) und Besatzdichte (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1) müssen der jeweils verwendeten Art entsprechen (siehe Anlage 2).

18. Nach einer 48-stündigen Akklimatisierung werden die Mortalitäten erfasst; dabei wird nach folgenden Kriterien vorgegangen:
 - Bei Mortalitäten von mehr als 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen ist die gesamte Charge zu verwerfen.
 - Bei Mortalitäten zwischen 5 und 10 % der Population sollten die Fische für weitere sieben Tage akklimatisiert werden; wenn die Mortalität auch in den zusätzlichen sieben Tagen noch über 5 % liegt, ist die gesamte Charge zu verwerfen.
 - Bei Mortalitäten von weniger als 5 % der Population innerhalb sieben Tagen wird die Charge akzeptiert.
19. Während der Akklimatisierung, der Präexposition und der eigentlichen Exposition sollten Fische nicht gegen Krankheiten behandelt werden.

Präexposition und Auswahl der Fische

20. Eine einwöchige Präexposition wird empfohlen; dabei werden die Fische in prüfgefäßähnliche Becken gesetzt. Während der gesamten Haltungsdauer und während der Exposition werden die Fische *ad libitum* gefüttert. Die Expositionsphase beginnt mit sexuell dimorphen adulten, aktiv laichenden Fischen aus einer Laborpopulation geschlechtsreifer Tiere (z. B. mit deutlichen sekundären Geschlechtsmerkmalen bei Dickkopfelritzen und bei Japanischen Reiskärpflingen). Als Faustregel (nur im Kontext der Beobachtung des tatsächlichen Reproduktionsstatus einer bestimmten Charge anzuwenden) gilt, dass Dickkopfelritzen ca. 20 (± 2) Wochen alt sein sollten, vorausgesetzt, sie wurden während ihrer gesamten Lebensdauer bei einer Temperatur von 25 ± 2 °C gehalten. Unter denselben Bedingungen sollten Japanische Reiskärpflinge etwa 16 (± 2) Wochen alt sein. Zebraabärblinge sollten etwa 16 (± 2) Wochen alt sein, sofern sie während ihres gesamten Lebens bei 26 ± 2 °C gehalten wurden.

VERSUCHSPLAN

21. Für den Test sind drei Konzentrationen der Prüfchemikalie, eine Kontrolle (Wasser) und erforderlichenfalls eine Lösungsmittelkontrolle zu verwenden. Die Daten können analysiert werden, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollreaktion festzustellen. Diese Analysen dienen eher der Feststellung, ob die Chemikalie in weiteren Langzeittests auf unerwünschte Wirkungen (nämlich Überleben, Entwicklung, Wachstum und Reproduktion) untersucht werden muss, als der Verwendung für Risikobewertungen (24).
22. Bei Zebraabärblingen und bei Japanischen Reiskärpflingen wird an Tag 21 des Assay eine Stichprobe männlicher und weiblicher Tiere aus jeder Konzentrationsgruppe (jedes Replikat enthält 5 männliche und 5 weibliche Fische) und aus der/den Kontrollgruppe(n) auf Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale untersucht; bei den Dickkopfelritzen wird eine Stichprobe männlicher und weiblicher Tiere (jedes

der vier Replikate enthält 2 männliche und 4 weibliche Fische) auf Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale getestet.

Auswahl der Testkonzentrationen

23. Für die Zwecke dieses Assay sollte die höchste Testkonzentration auf die in einem Vorversuch bestimmte oder aus anderen Toxizitätsdaten hervorgehende höchste noch verträgliche Konzentration (*Maximum Tolerated Concentration*, MTC) oder auf 10 mg/l oder auf den Höchstwert der Wasserlöslichkeit festgesetzt werden, je nach dem, welcher Wert der niedrigere ist. Der MTC-Wert gilt als die höchste Testkonzentration der Chemikalie, bei der die Mortalität weniger als 10 % beträgt. Dieser Ansatz geht davon aus, dass empirische Daten zur akuten Toxizität oder sonstige Toxizitätsdaten vorliegen, anhand deren der MTC-Wert bestimmt werden kann. Die Schätzung des MTC-Wertes kann ungenau sein und setzt in der Regel Fachkenntnis voraus.
24. Benötigt werden drei Testkonzentrationen mit einem konstanten Abstandsfaktor von maximal 10 und eine Verdünnungswasserkontrolle. Empfohlen werden Abstandsfaktoren zwischen 3,2 und 10.

VERFAHREN

Auswahl und Wiegen der Testfische

25. Wichtig ist, dass die Größenunterschiede der Fische zu Beginn des Tests möglichst gering sind. Für geeignete Größenbereiche für die empfohlenen Testspezies siehe Anlage 2. Bei der gesamten Charge der in diesem Test verwendeten Fische sollte bei männlichen und weiblichen Tieren das individuelle Gewicht möglichst im Bereich von $\pm 20\%$ des arithmetischen Mittelgewichts der Fische gleichen Geschlechts liegen. Um das Mittelgewicht zu bestimmen, sollte vor dem Test eine Teilprobe des Fischbestands gewogen werden.

Expositionsbedingungen

Dauer

26. Der Test dauert 21 Tage nach vorheriger (möglichst einwöchiger) Präexposition.

Fütterung

27. Die Fische werden *ad libitum* so oft mit geeignetem Futter (Anlage 2) versorgt, wie für eine normale Entwicklung der Tiere nötig ist. Dabei ist darauf zu achten, dass es nicht zu einer Vermehrung von Mikroorganismen und nicht zu einer Eintrübung des Wassers kommt. Im Allgemeinen kann die Tagesration auf zwei oder drei gleiche Portionen verteilt werden, die in mindestens dreistündigem Abstand zu verabreichen sind. Insbesondere an Wochenenden kann eine einzige, größere Ration gegeben werden. 12 Stunden vor der Probenahme/Sektion sollten die Fische nicht mehr

gefüttert werden.

28. Das Fischfutter ist auf Verunreinigungen wie chlororganische Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) zu untersuchen. Futter mit erhöhtem Gehalt an Phytoöstrogenen, die die Testreaktion auf bekannte Östrogenagonisten (z. B. 17-beta-Östradiol) beeinträchtigen würden, darf nicht verwendet werden.
29. Nicht aufgenommenes Futter und Fäkalien sind mindestens zweimal wöchentlich aus den Prüfgefäßen zu entfernen (etwa durch vorsichtiges Absaugen vom Beckenboden).

Licht und Temperatur

30. Die Photoperiode (Hell-/Dunkel-Phasen) und die Wassertemperatur müssen Testspezies entsprechen (siehe Anlage 2).

Häufigkeit der Analysen und Messungen

31. Vor Beginn der Exposition ist zu überprüfen, ob die Chemikalienbeschickung einwandfrei funktioniert. Es dürfen ausschließlich anerkannte Analysemethoden angewandt werden, und die Stabilität der Chemikalie im Prüfsystem muss hinreichend bekannt sein. Während der Prüfung sind die Konzentrationen der Prüfchemikalie in regelmäßigen Zeitabständen wie folgt zu bestimmen: Die Zuflussmengen der Verdünnungslösung und der Stammlösung der Prüfchemikalie sind regelmäßig – vorzugsweise täglich, jedoch mindestens zweimal wöchentlich – zu kontrollieren und sollten während der gesamten Prüfung um maximal 10 % schwanken. Die tatsächlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie sollten zu Beginn der Prüfung in allen Gefäßen und danach wöchentlich gemessen werden.
32. Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während der gesamten Prüfung jedoch zufriedenstellend innerhalb der nominellen Konzentration ($\pm 20\%$) gehalten, so können sich die Ergebnisse auch auf die Nennwerte oder die gemessenen Werte beziehen.
33. Unter Umständen müssen die Proben gefiltert (z. B. mit Filtern einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$) oder zentrifugiert werden. Erforderlichenfalls ist Zentrifugierung vorzuziehen. Prüfchemikalien, die sich nachweislich nicht an Filter adsorbieren, können auch filtriert werden.
34. Während der Prüfung sollten bei allen Prüfgefäßen mindestens einmal wöchentlich der gelöste Sauerstoff, die Temperatur und der pH-Wert gemessen werden. Die Gesamthärte und die Gesamtalkalität sollten in den Kontrollen und in einem Gefäß mit höchster Konzentration ebenfalls mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Es wird empfohlen, dass die Temperatur in mindestens einem Prüfgefäß kontinuierlich überwacht wird.

Beobachtungen

35. Im Laufe oder am Ende des Assay sind verschiedene allgemeine Reaktionen (z. B. Überleben) sowie spezifische biologische Reaktionen (z. B. Vitellogenin-Gehalt) zu bestimmen. Die Messung und Auswertung dieser Endpunkte und die Verwendbarkeit der Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

Überleben

36. Die Fische sind während der Prüfung täglich zu kontrollieren; Todesfälle sind zu protokollieren und tote Fische sobald wie möglich zu entfernen. Tote Fische dürfen weder in Kontroll- noch in Prüfgefäße eingesetzt werden. Das Geschlecht der im Test gestorbenen Fische wird durch makroskopische Gonadenuntersuchung bestimmt.

Verhalten und Aussehen

37. Jegliches anomale Verhalten (gemessen an den Kontrollen) ist zu protokollieren. Dies gilt für Anzeichen allgemeiner Toxizität ebenso wie für Hyperventilation, unkoordinierte Schwimmbewegungen, Gleichgewichtsverluste und atypische Apathie oder ungewöhnliches Fressverhalten. Zudem sind äußerliche Auffälligkeiten (z. B. Blutungen oder Verfärbungen) aufzuzeichnen. Derartige Anzeichen einer toxischen Wirkung sind bei der Datenauswertung insoweit sorgfältig zu berücksichtigen, als sie auf Konzentrationen hinweisen können, bei denen die Biomarker endokriner Wirkungen keine zuverlässigen Rückschlüsse gestatten. Diese Verhaltensauffälligkeiten können auch wertvolle qualitative Informationen liefern, an denen sich künftige Fischtests orientieren können. Bei Dickkopfelritzen wurde unter Einwirkung von Androgenen beispielsweise aggressives Territorialverhalten bei normalen Männchen oder maskulinisierten Weibchen beobachtet. Bei Zebraabärblingen hemmen Östrogene oder Anti-Östrogene das typische Paarungs- und Laichverhalten bei einsetzender Morgendämmerung.

38. Da sich verschiedene äußere Merkmale (in erster Linie die Farbe) beim Hantieren der Fische rasch verändern können, sind qualitative Beobachtungen vor der Entnahme von Fischen aus dem Prüfsystem wichtig: Bisherige Erfahrungen mit Dickkopfelritzen führen zu dem Schluss, dass einige endokrin wirkende Chemikalien anfangs zu Veränderungen der folgenden äußeren Merkmale führen: Körperfarbe (hell oder dunkel), Farbmusterung (Auftreten vertikaler Streifen) und Körperform (im Kopf- oder Schwanzbereich). Daher muss im Laufe und am Ende der Prüfung das äußere Erscheinungsbild der Fische kontrolliert werden.

Schmerzfreies Töten

39. An Tag 21, d. h. bei Ablauf der Expositionsdauer, sind die Fische mit angemessenen Mengen Tricain (Tricainmethansulfonat, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l gepuffert mit 300 mg/l NaHCO₃ (Natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) zu töten, um Schleimhautreizungen zu begrenzen. Anschließend wird zur Vitellogenin-Bestimmung Blut oder Gewebe entnommen, wie im Abschnitt über Vitellogenin beschrieben.

Untersuchung sekundärer Geschlechtsmerkmale

40. Manche endokrin wirkende Chemikalien können Veränderungen spezifischer sekundärer Geschlechtsmerkmale (Anzahl Laichknoten bei männlichen Dickkopfelritzen oder Papillenprozesse bei männlichen Japanischen Reiskarpfingen) zur Folge haben. Insbesondere Chemikalien mit bestimmten Wirkungsweisen können bei Tieren des jeweils anderen Geschlechts zu Anomalien der sekundären Geschlechtsmerkmale führen. So können Androgenrezeptor-Agonisten wie Trenbolon, Methyltestosteron und Dihydrotestosteron bewirken, dass weibliche Dickkopfelritzen ausgeprägten Laichausschlag („Nuptialtuberkel“) entwickeln oder dass bei weiblichen Japanischen Reiskarpfingen Papillenprozesse auftreten (11)(20)(21). Außerdem wurde berichtet, dass Östrogenrezeptor-Agonisten dazu führen können, dass sich die Zahl der Laichknoten und die Größe des dorsalen Nackenaufwuchses bei adulten Männchen verringern (25)(26). Diese wesentlichen morphologischen Beobachtungen können auch eine qualitativ und quantitativ wertvolle Informationsgrundlage für potenzielle künftige Fischttests liefern. Anzahl und Größe der Laichknoten bei Dickkopfelritzen und Papillenprozesse bei Japanischen Reiskarpfingen können entweder direkt oder – bequemer – an konservierten Exemplaren gezählt werden. Die Anlagen 5A und 5B enthalten Empfehlungen für Verfahren zur Beurteilung sekundärer Geschlechtsmerkmale bei Dickkopfelritzen bzw. Japanischen Reiskarpfingen.

Vitellogenin (VTG)

41. Das für die VTG-Bestimmung erforderliche Blut wird mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzarterie/-vene oder alternativ durch Herzpunktion mit einer Spritze entnommen. Je nach Größe der Fische werden bei Dickkopfelritzen 5-60 µl und bei Zebrabärblingen 5-15 µl Blut (jeweils pro Fisch) benötigt. Das Plasma wird durch Zentrifugieren vom Blut getrennt und mit Proteasehemmern bis zur Vitellogenin-Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Alternativ kann bei Zebrabärblingen die Leber verwendet werden; bei Zebrabärblingen kommen Kopf-/Schwanz-Homogenate als Gewebematerial für die Vitellogenin-Analyse in Betracht (Anlage 6). Die VTG-Messung sollte nach einer validierten homologen ELISA-Methode mit homologem VTG-Standard und homologen Antikörpern erfolgen. Empfohlen werden Methoden, mit denen kleinste VTG-Gehalte (wenige ng/ml Plasma oder ng/mg Gewebe, die der Hintergrundkonzentration bei nicht exponierten männlichen Fischen entsprechen) ermittelt werden können.

42. Die Qualitätskontrolle der Vitellogenin-Analyse erfolgt anhand von Standards, Blindproben und zumindest Doppelanalysen. Für jede ELISA-Methode ist ein Test auf Matrixeffekte (Effekte der Probenverdünnung) vorzunehmen, um den Mindestverdünnungsfaktor zu ermitteln. Alle für VTG-Analysen verwendeten ELISA-Platten müssen zumindest auch folgende Proben für die Qualitätskontrolle enthalten: 6 Kalibrierstandards für den gesamten Bereich der erwarteten Vitellogenin-Konzentrationen und eine nicht spezifische Binding-Assay-Blindprobe (doppelt zu analysieren). Die Absorption dieser Blindproben sollte weniger als 5 % der maximalen Adsorption des Kalibrierstandards betragen. Von jeder Verdünnung sind mindestens zwei Aliquoten (Muldenduplikate) zu analysieren. Duplikatmulden mit über 20 % Differenz sollten ein zweites Mal analysiert werden.

43. Der Korrelationskoeffizient (R^2) für Kalibrierkurven sollte größer als 0,99 sein. Eine hohe Korrelation reicht jedoch nicht aus, um in allen Bereichen Konzentrationen adäquat vorabzuschätzen. Neben der Notwendigkeit einer hinreichend hohen Korrelation für die Kalibrierkurve sollte alle aus der Kalibrierkurve errechneten Konzentrationen der einzelnen Standards im Bereich von 70-120 % der jeweiligen nominellen Konzentration liegen. Wenn die nominellen Konzentrationen tendenziell von der Regressionsgeraden abweichen (beispielsweise bei niedrigeren Konzentrationen), muss die Kalibrierkurve möglicherweise in niedrige und hohe Bereiche aufgeteilt oder ein nicht lineares Modell für die Adsorptionsdaten verwendet werden. Bei geteilten Kurven muss der Korrelationskoeffizient R^2 bei beiden Segmenten $> 0,99$ sein.
44. Als Nachweisgrenze wird die Konzentration des niedrigsten Analysestandards bezeichnet; die Quantifizierungsgrenze ist die Konzentration des niedrigsten Analysestandards multipliziert mit dem niedrigsten Verdünnungsfaktor.
45. An den Tagen, an denen Vitellogenin-Analysen stattfinden, ist eine mit einem Inter-Assay-Referenzstandard hergestellte Anreicherungsprobe zu analysieren (Anlage 7). Das Verhältnis der erwarteten zur gemessenen Konzentration ist zusammen mit den Ergebnissen der am diesem Tag durchgeführten Testreihen aufzuzeichnen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung von Biomarkerreaktionen durch Varianzanalyse (ANOVA)

46. Um die potenziell endokrine Aktivität einer Chemikalie zu ermitteln, werden die Wirkungen in den Prüf- und in den Kontrollgefäßen mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Wird eine Lösungsmittelkontrolle verwendet, sollten Verdünnungswasser und Lösungsmittelkontrollen zur Ermittlung der jeweiligen Endpunkte statistisch analysiert werden. Für Leitlinien zur Auswertung von Daten über Verdünnungswasser und Lösungsmittelkontrollen für die anschließende statistische Analyse siehe OECD 2006c (27). Alle Daten zu biologischen Reaktionen sind nach Geschlechtern zu analysieren und aufzuzeichnen. Sind die Voraussetzungen für parametrische Methoden nicht erfüllt, d. h. keine Normalverteilung (z. B. Shapiro-Wilk-Test) oder heterogene Varianz (Bartlett-Test oder Levene-Test), sollte vor der ANOVA eine Datentransformation zur Varianzhomogenisierung in Betracht gezogen oder eine gewichtete ANOVA durchgeführt werden. Bei nicht monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehungen kann der (parametrische) Dunnett-Test (Paarvergleiche) oder ein (nicht parametrischer) Mann-Whitney-Test mit Anpassung nach Bonferroni durchgeführt werden. Andere statistische Tests kommen ebenfalls in Betracht (z. B. ein Jonckheere-Terpstra- oder ein Williams-Test), wenn die Dosis-Wirkungs-Beziehung annähernd monoton ist. Das statistische Flussdiagramm in Anlage 8 soll die Auswahl des jeweils am besten geeigneten statistischen Tests erleichtern. Für weitere Informationen siehe OECD-Dokument „*Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*“ (27).

Testergebnisse

47. Die Versuchsdaten sollten Folgendes umfassen:

Prüfinstitut:

- Verantwortliche Mitarbeiter und ihre jeweiligen Zuständigkeiten im Rahmen des Assay
- Jedes Labor muss für repräsentative Chemikalien einen Eignungstest absolviert haben.

Prüfchemikalie:

- Charakterisierung der Prüfchemikalie;
- physikalischer Zustand und physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Methode und Häufigkeit der Herstellung von Testkonzentrationen;
- Angaben zur Stabilität und zur biologischen Abbaubarkeit.

Lösungsmittel:

- Charakterisierung des Lösungsmittels (Beschaffenheit und verwendete Konzentration);
- Gründe für die Wahl des jeweiligen Lösungsmittels (wenn nicht nur Wasser als Lösungsmittel verwendet wird).

Testtiere:

- Art und Stamm;
- Bezugsquelle und Angaben zur jeweiligen Bezugsanlage;
- Alter der Fische zu Beginn der Prüfung und Reproduktions- /Laichstatus;
- Angaben zur Akklimatisierungsverfahren;
- Körpergewicht der Fische zu Beginn der Exposition (aus einer Teilprobe des Fischbestands).

Prüfbedingungen:

- angewandte Prüfmethode (Testtyp, Besatz(verhältnis), Besatzdichte usw.);
- Methode für die Herstellung der Stammlösungen und Durchflussrate;
- nominelle Testkonzentrationen, wöchentlich gemessene Konzentrationen der Testlösungen und angewandte Analyseverfahren, mittlere Messwerte und Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie Nachweis, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der tatsächlichen Lösung beziehen;
- Merkmale des Verdünnungswassers (pH-Wert, Härte, Alkalität, Temperatur, Konzentration an gelöstem Sauerstoff, Restchlorgehalt, Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff, suspendierte Feststoffen und andere ermittelte Messwerte);
- Wasserqualität in den Prüfgefäßen; pH-Wert, Härte, Temperatur und Konzentration an gelöstem Sauerstoff;
- detaillierte Angaben zur Fütterung (Art des Futters, Bezugsquelle/Herkunft, verfütterte Menge und Häufigkeit der Fütterung sowie, soweit vorhanden, Analysen zur Feststellung etwaiger Schadstoffe (z. B. PCB, PAH und chlororganische Pestizide).

Ergebnisse

- Nachweis, dass die Kontrollen die Validitätskriterien der Prüfung erfüllen;
- Daten zu Mortalitäten für Testkonzentrationen und Kontrolle;
- angewandte statistische Analyseverfahren, Datenauswertung und Gründe für die

- Wahl der angewandten Methoden;
- Daten zu biologischen Beobachtungen (deutliche morphologische Änderungen u. a. der sekundären Geschlechtsmerkmale und der Vitellogenin-Konzentration);
 - Ergebnisse der Datenanalysen, vorzugsweise in tabellarischer in grafischer Form;
 - ungewöhnliche Reaktionen der Fische sowie jegliche sichtbare Wirkungen der Prüfchemikalie.

LEITLINIEN FÜR DIE AUSWERTUNG UND VALIDITÄT DER TESTERGEBNISSE

48. Dieser Abschnitt enthält Empfehlungen für die Auswertung der Testergebnisse für die gemessenen Endpunkte. Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, wenn die Prüfchemikalie eindeutig toxisch wirkt oder den Allgemeinzustand der Testtiere verschlechtert.
49. Bei der Festlegung der Bandbreite der Prüfchemikalienkonzentrationen ist darauf zu achten, dass die für eine aussagekräftige Datenauswertung höchste noch verträgliche Konzentration nicht überschritten wird. Wichtig ist dabei, dass bei mindestens einer Konzentration keine Anzeichen einer toxischen Wirkung festgestellt werden. Krankheitssymptome und Anzeichen toxischer Wirkungen sind gründlich zu untersuchen und aufzuzeichnen. Beispielsweise kann die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren auch durch allgemeine Toxizität und nichtendokrine toxische Wirkungsweisen (z. B. durch Hepatotoxizität) beeinträchtigt werden. Die Wirkungsauswertung lässt sich jedoch durch andere Konzentrationen untermauern, die nicht durch systemische Toxizität beeinträchtigt werden.
50. Um Testergebnisse als gültig anerkennen zu können, müssen bestimmte Aspekte berücksichtigt werden. Als Faustregel gilt, dass sich die VTG-Konzentrationen in Kontrollgruppen männlicher und weiblicher Fische bei Dickkopfelritzen und bei Zebraabärblingen in etwa um mindestens drei Größenordnungen und bei Japanischen Reiskarpfingen in etwa um mindestens eine Größenordnung unterscheiden müssen. Für Beispiele für den Wertebereich bei Kontroll- und Behandlungsgruppen siehe Validierungsberichte (1)(2)(3)(4). Hohe VTG-Konzentrationen bei männlichen Kontrollfischen könnten die Aussagekraft des Assay und dessen Fähigkeit zum Nachweis schwacher Östrogen-Agonisten beeinträchtigen. Und niedrige VTG-Konzentrationen bei weiblichen Kontrollfischen könnten die Aussagekraft des Assays und dessen Fähigkeit zum Nachweis von Aromatasehemmern und Östrogen-Antagonisten beeinträchtigen. Die Empfehlungen beruhen auf diesen Validierungsstudien.
51. Führt ein Labor den Assay zum ersten Mal durch oder wurden wesentliche Änderungen vorgenommen (beispielsweise Änderungen des Fischstammes oder der Bezugsquelle), sollte eine technische Eignungsprüfung durchgeführt werden. Nach Möglichkeit sollten Chemikalien verwendet werden, die ein breites Spektrum an Wirkungsweisen oder Wirkungen auf mehrere Test-Endpunkte abdecken. Die Labors werden aufgefordert, für männliche und weibliche Tiere eigene historische Kontrolldaten zu sammeln und eine positive Kontrollchemikalie (z. B. 17 β -Östradiol in einer Konzentration von 100 ng/l oder einen bekannten schwachen Agonisten) auf östrogene Wirkung mit erhöhter VTG-Konzentration in männlichen Fischen, eine

positive Kontrollchemikalie (z. B. Fadrozol oder Prochloraz in einer Konzentration von 300 µg/l) auf Aromatasehemmung mit reduzierter VTG-Konzentration in weiblichen Fischen und eine positive Kontrollchemikalie (z. B. 17β-Trenbolon in einer Konzentration von 5 µg/l) auf androgene Wirkung und resultierender Induktion sekundärer Geschlechtsmerkmale bei weiblichen Dickkopfelritzen und weiblichen Japanischen Reiskarpfingen zu prüfen. Diese Daten können insgesamt mit verfügbaren Daten aus den Validierungsstudien (1)(2)(3) verglichen werden, um die Eignung des jeweiligen Labors sicherzustellen.

52. Grundsätzlich gelten Vitellogenin-Messungen als positiv, wenn eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der VTG-Konzentration in männlichen Fischen oder eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Reduzierung bei weiblichen Fischen zumindest bei der höchsten geprüften Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt wird und keine Anzeichen einer allgemeinen Toxizität vorliegen. Ein positives Ergebnis wird auch durch Nachweis einer biologisch plausiblen Beziehung zwischen der Dosis- und der Wirkungskurve bestätigt. Wie bereits erläutert, muss eine Reduzierung der VTG-Konzentration nicht unbedingt endokrinen Ursprungs sein. Ein positives Ergebnis sollte jedoch grundsätzlich als *In-vivo*-Nachweis einer endokrinen Wirkung ausgelegt werden und zur Klärung weitere Untersuchungen nach sich ziehen.

LITERATUR

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Nicht veröffentlichter Bericht vom 15. Dezember 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 S.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter und Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski, S, Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.

- (9) Andersen, L., Goto-Kazato, R., Trant, J.M., Nash, J.P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- (11) Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Hurd, K.S., Sherren, A., Stanley, R.D., Tyler, C.R. (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., Sullivan, C.V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter, G.H., Tyler, C.R., Maddix, S., Campbell, P.M., Hutchinson, T.H., Länge, R., Lye, C., Sumpter, J.P., 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG-Forschungsbericht AQ001. CEFIC, Brüssel, Belgien.
- (14) Fenske, M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Noerum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.

- (17) Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota, H., Morita, H., Nakano, N., Kang, I.J., Tadokoro, H., Oshima, Y., Honjo, T., Kobayashi, K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.
- (19) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., und Iguchi, T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Homung, M.W., Henry T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, L.E. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (21) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K. (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. *Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris*
- (23) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76 ; S. 69-92.
- (24) Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H, Tyler, C.R., 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts,“ not „traffic lights,“ in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
- (25) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
- (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve und G.T. Ankley. 2008.

Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.

- (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD-Veröffentlichungen zu Gesundheit und Arbeitsschutz, Reihe „*Testing and Assessment*“, Nr. 54, ENV/JM/MONO(2006)18
- (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (geänd.). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

Anlage 1

ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

VK: Variationskoeffizient.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Besatz: Verhältnis des Nassgewichts der Fische zum Wasservolumen.

Besatzdichte: Anzahl Fische je Wasservolumen.

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

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

MTC: höchste noch verträgliche Konzentration, etwa 10 % des LC₅₀-Werts.

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

Anlage 2

VERSUCHSBEDINGUNGEN FÜR DEN FISCH-SCREENING-TEST ZUR BESTIMMUNG ENDOKRINER WIRKUNGEN

1. Empfohlene Arten	Dickkopfritze (<i>Pimephales promelas</i>)	Japanischer Reiskärpfling (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)
2. Testtyp	Durchflusssystem	Durchflusssystem	Durchflusssystem
3. Wassertemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Beleuchtung	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)
5. Lichtintensität	10-20 µE/m ² /s, 540-1000 lx, oder 50-100 ft-c (Laborqualität)	10-20 µE/m ² /s, 540-1000 lx, oder 50-100 ft-c (Laborqualität)	10-20 µE/m ² /s, 540-1000 lx, oder 50-100 ft-c (Laborqualität)
6. Photoperiode (Morgen- /Abenddämmerungsphasen optional; nicht unbedingt erforderlich)	16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit	12-16 Std. Licht, 12-8 Std. Dunkelheit	12-16 Std. Licht, 12-8 Std. Dunkelheit
7. Besatz	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Größe der Prüfkammern	10 l (mind.)	2 l (mind.)	5 l (mind.)
9. Volumen der Testlösung	8 l (mind.)	1,5 l (mind.)	4 l (mind.)
10. Erneuerung der Testlösungen	Mindestens 6-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich
11. Alter der Testorganismen	Siehe Nummer 20	Siehe Nummer 20	Siehe Nummer 20
12. Ungefähres Nassgewicht der adulten Fische (g)	Weibchen: 1,5 ± 20 % Männchen: 2,5 ± 20 %	Weibchen: 0,35 ± 20 % Männchen: 0,35 ± 20 %	Weibchen: 0,65 ± 20 % Männchen: 0,4 ± 20 %
13. Anzahl Fische pro Prüfgefäß	6 (2 Männchen, 4 Weibchen)	10 (5 Männchen, 5 Weibchen)	10 (5 Männchen, 5 Weibchen)

14. Anzahl der Behandlungen	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)
15. Anzahl Gefäße je Behandlung	Mindestens 4	Mindestens 2	Mindestens 2
16. Anzahl der Fische je Testkonzentration	16 adulte Weibchen und 8 Männchen (4 Weibchen und 2 Männchen pro Replikatgefäß)	10 adulte Weibchen und 10 Männchen (5 Weibchen und 5 Männchen pro Replikatgefäß)	10 adulte Weibchen und 10 Männchen (5 Weibchen und 5 Männchen pro Replikatgefäß)
17. Fütterungsregime	Lebende oder tiefgefrorene adulte Salinenkrebse oder Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (<i>ad libitum</i>), handelsübliches Futter oder beides in Kombination	Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (<i>ad libitum</i>), handelsübliches Futter oder beides in Kombination	Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (<i>ad libitum</i>), handelsübliches Futter oder beides in Kombination
18. Belüftung	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %
19. Verdünnungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser
20. Dauer der Präexposition	möglichst 7 Tage	möglichst 7 Tage	möglichst 7 Tage
21. Expositionsdauer	21 Tage (d)	21 Tage (d)	21 Tage (d)
22. Biologische Endpunkte	- Überleben - Verhalten - Sekundäre Geschlechtsmerkmale - VTG	- Überleben - Verhalten - Sekundäre Geschlechtsmerkmale - VTG	- Überleben - Verhalten - VTG

23. Validität des Tests

Gelöster Sauerstoff
> 60 % Sättigung;
mittlere Temperatur
 $25 \pm 2 \text{ °C}$; 90 %ige
Überlebensrate der
Fische in den
Kontrollen; gemessene
Testkonzentrationen
innerhalb von 20 % der
mittleren Messwerte je
Behandlungsstufe.

Gelöster Sauerstoff
> 60 % Sättigung;
mittlere Temperatur
 $24 \pm 2 \text{ °C}$; 90 %ige
Überlebensrate der
Fische in den
Kontrollen; gemessene
Testkonzentrationen
innerhalb von 20 %
der mittleren
Messwerte je
Behandlungsstufe.

Gelöster Sauerstoff
> 60 % Sättigung;
mittlere Temperatur
 $26 \pm 2 \text{ °C}$; 90 %ige
Überlebensrate der
Fische in den
Kontrollen;
gemessene
Testkonzentrationen
innerhalb von 20 %
der mittleren
Messwerte je
Behandlungsstufe.

Anlage 3

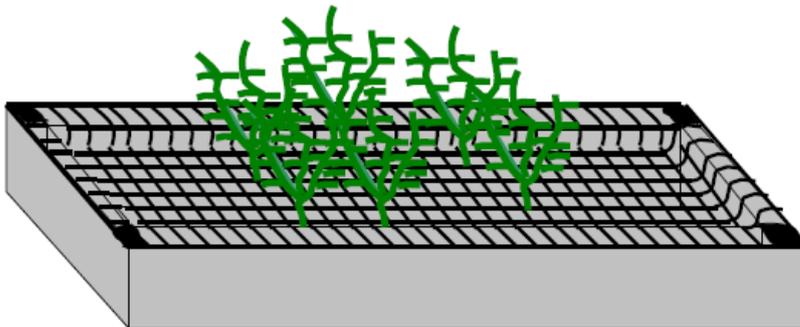
CHEMISCHE MERKMALE EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

<i>Bestandteil</i>	<i>KONZENTRATIONEN</i>
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nichtionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

Anlage 4A

LAICHSUBSTRAT FÜR ZEBRABÄRBLINGE

Laichschale: beliebige Instrumentenschale aus Glas, beispielsweise 22x15x5,5 cm (L x B x T), abgedeckt mit abnehmbarem Maschendrahtgitter aus Edelstahl (Maschenweite 2 mm); das Gitter sollte die Schale unterhalb des Randes komplett abdecken.



Auf dem Gitter das Laichsubstrat fixieren. Dabei eine Struktur gewährleisten, in die sich die Fische zurückziehen können. Geeignet sind beispielsweise Aquariumpflanzen aus grünem Kunststoff. (Hinweis: eine mögliche Adsorption der Prüfchemikalie an das Kunststoffmaterial muss in diesem Fall berücksichtigt werden.) Das Kunststoffmaterial in einer ausreichenden Menge warmen Wassers waschen, um sicherzustellen, dass etwa vorhandene Chemikalien ausgetrieben werden und nicht in das Testwasser gelangen. Bei Verwendung von Materialien aus Glas ist sicherzustellen, dass die Fische weder verletzt noch bei heftigen Schwimmbewegungen eingeeengt werden.

Der Abstand zwischen der Schale und den Glasscheiben muss mindestens 3 cm betragen, damit die Laichablage nicht außerhalb der Schale erfolgt. Die in die Schale abgelegten Eier fallen durch das Gitter und können 45-60 Minuten nach Einschalten der Beleuchtung entnommen werden. Die transparenten Eier haften nicht aneinander an und können bei transversaler Beleuchtung leicht gezählt werden. Bei fünf Weibchen pro Gefäß gelten bis zu 20 Eier/Tag als wenig, bis zu 100 Eier/Tag als mittel und über 100 Eier/Tag als viel. Die Laichschale herausnehmen, die Eier einsammeln und die Laichschale wieder in das Prüfgefäß stellen – entweder so spät wie möglich am Abend oder sehr früh am Morgen. Bis zum erneuten Einstellen darf höchstens eine Stunde vergehen, da der vom Laichsubstrat ausgehende Reiz dazu führen kann, dass es zu ungewöhnlichen Zeitpunkten zu Paarung und Laichablage kommt. Wird die Laichschale dennoch später in die das Prüfbecken gestellt, so sollte dies frühestens 9 Stunden nach dem Einschalten der Beleuchtung geschehen. Zu diesem späten Tageszeitpunkt erfolgt keine Laichablage mehr.

Anlage 4B

LAICHSUBSTRAT FÜR DICKKOPFELRITZEN

Zwei oder drei kombinierte Platten und Schalen aus Kunststoff/Keramik/Glas oder Edelstahl als Laichunterlage in die Prüfkammern (z. B. 80 mm lange graue halbrunde Rinnen, aufgesetzt auf eine gebördelte, 130 mm lange Schale) stellen (siehe Abbildung). Gut akklimatisierte PVC- oder Keramikacheln haben sich als Laichunterlage bewährt (Thorpe *et al*, 2007).

Die Platten anrauen, um die Haftung zu verbessern. Wenn nicht erwiesen ist, dass die Eier zuverlässig an der Laichunterlage haften, die Schalen außerdem mit einem Gitter abdecken, damit die Fische nicht an herabgefallene Eier gelangen.



Die Unterlage soll alle Eier aufnehmen können, die nicht an der Plattenoberfläche haften bleiben und folglich auf den Boden des Beckens fallen (sowie alle Eier, die direkt auf der flache Kunststoffunterlage abgelegt werden). Alle Laichunterlagen sind vor Gebrauch mindestens 12 Stunden mit Verdünnungswasser zu spülen, um etwa vorhandene Schadstoffe auszutreiben.

LITERATUR

Thorpe, K.L., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Anlage 5A

BEWERTUNG DER SEKUNDÄREN GESCHLECHTSMERKMALE BEI DICKKOPFELRITZEN ZUM NACHWEIS BESTIMMTER CHEMIKALIEN MIT ENDOKRINER WIRKUNG

Übersicht

Für Tests zum Nachweis endokriner Disruptoren potenziell wichtige äußere Merkmale bei adulten Dickkopfelnritzen sind die Körperfärbung (hell/dunkel), die Farbmusterung (Vorhandensein oder Nichtvorhandensein senkrechter Streifen), die Körperform (Kopf- und Rumpfform, abdominale Distension) sowie spezifische sekundäre Geschlechtsmerkmale (Anzahl und Größe der Laichknoten, Größe des dorsalen Aufwuchses und des Ovipositors).

Laichauschlag tritt am Kopf (dorsaler Aufwuchs) paarungsbereiter männlicher Dickkopfelnritzen auf, gewöhnlich beidseitig symmetrisch (Jensen et al. 2001). Bei weiblichen Kontrollfischen sowie juvenilen männlichen und weiblichen Fischen zeigt sich kein Ausschlag (Jensen et al. 2001). Um die Augen und zwischen den Nasenöffnungen männlicher Tiere können sich bis zu acht Knoten bilden. Die meisten und größten Knoten finden sich in zwei parallelen Reihen unmittelbar unter den Nasenöffnungen und über dem Maul. Bei vielen Fischen befinden sich Knotengruppierungen auch unterhalb des Unterkiefers; die in unmittelbarer Nähe des Mauls befindlichen Knoten treten gewöhnlich als einzelnes Paar auf; ventral können sich Gruppen von bis zu vier Knoten entwickeln. In der Regel bilden sich selten mehr als 30 Knoten (typischerweise 18-28; Jensen et al. 2001). Zumeist entwickeln sich Laichknoten als einzelne, verhältnismäßig runde Ausstülpungen, deren Höhe in etwa ihrem Radius entspricht. Die meisten paarungsbereiten Männchen weisen zumindest auch einige Knoten auf, die derart groß und auffällig sind, dass sie als Einzelstrukturen kaum erkennbar noch sind.

Einige Arten endokrin wirkender Chemikalien können beim jeweils anderen Geschlecht zu anomalen sekundären Geschlechtsmerkmalen führen. So können Androgenrezeptor-Agonisten wie 17 β -Methyltestosteron oder 17 β -Trenbolon bewirken, dass sich bei weiblichen Dickkopfelnritzen Laichknoten bilden (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), während Östrogenrezeptor-Agonisten bei männlichen Tieren zu einer Verringerung der Anzahl oder Größe der Laichknoten führen können (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Laichauschlag bei Dickkopfelnritzen wird nachstehend nach Verfahren charakterisiert, wie sie im Labor der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde (*Environmental Protection Agency*) in Duluth, MN, üblich sind. Spezifische Produkte und/oder Geräte können durch verfügbare vergleichbare Materialien ersetzt werden.

Eine Sichtprüfung erfolgt am besten unter einem beleuchteten Vergrößerungsglas oder einem beleuchteten Stereomikroskop mit Dreifach-Vergrößerung. Die Fische dorsal mit der

vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend (d. h. Kopf zum Betrachter hin) untersuchen.

- a) Fisch mit vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend und in Bauchlage in eine kleine Petrischale (z. B. 100 mm Durchmesser) legen. Sucher scharf einstellen, damit die Laichknoten erkennbar werden. Fisch vorsichtig und langsam von einer Seite auf die andere drehen, um die Ausbreitung des Laichausschlags zu bestimmen. Laichknoten zählen und einstufen.
- b) Untersuchung an der ventralen Kopfseite wiederholen; dazu den Fisch mit der dorsalen vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend in die Petrischale legen.
- c) Die Untersuchung sollte pro Fisch nicht länger als 2 Minuten dauern.

Zählen und Einstufen der Laichknoten

Zur Bewertung des Laichausschlags und seiner Ausprägung bei adulten Dickkopfelritzen wurden sechs Bereiche identifiziert. Zur Veranschaulichung der Ausschlagregionen und der Zahl vorhandener Laichknoten wurde eine Vorlage (Formular) entwickelt (siehe Ende dieses Anhangs). Die Zahl der Laichknoten aufzeichnen, und die Knoten der Größe nach wie folgt einstufen: 0 – keine Laichknoten, 1 – präsent, 2 – vergrößert und 3 – ausgeprägt (Abb. 1).

Bewertung 0 bedeutet, dass keine Laichknoten vorhanden sind. Bewertung 1 – Laichknoten präsent - betrifft jeden Knoten, bei dem eine einzelne Ausstülpung in etwa dem Radius des Knotens (Halbmesser) entspricht. Bewertung 2 – vergrößerter Laichknoten - betrifft Knoten mit sternförmig ausgebildetem Gewebe, das sich in der Regel durch eine große Grundfläche mit von der Mitte ausgehenden Rillen oder Furchen auszeichnet. Nach oben sind die Laichknoten häufig stärker gezackt, können aber auch abgerundet sein. Bewertung 3 – ausgeprägter Laichausschlag - bedeutet in der Regel, dass die Ausschlagfläche verhältnismäßig groß und abgerundet und weniger strukturiert ist. Manchmal verschmelzen diese Knoten entlang einer oder mehrerer Regionen (B, C und D; s. u.). Farbe und Form sind ähnlich wie bei Bewertung 2, was manchmal die Unterscheidung erschwert. Eine Einstufung nach diesem System ergibt bei normalen männlichen Kontrollexemplaren mit 18-20 Laichknoten einen Gesamtwert von < 50 Knoten (Jensen et al. 2001).



Abbildung 1

Die tatsächliche Anzahl Laichknoten kann bei bestimmten Fischen größer sein als das Formularfeld (Anlage A) für die einzustufende Ausschlagregion zulässt. In diesem Fall können rechts oder links neben dem betreffenden Feld zusätzliche Einstufungen angegeben werden. Die Vorlage muss daher nicht unbedingt Symmetrie aufzeigen. Eine weitere Methode zur Veranschaulichung paarweise auftretender oder vertikal auf der horizontalen Ebene des Mauls verbundener Laichknoten besteht in der doppelten Markierung zweier Einstufungen innerhalb eines einzigen Feldes.

Zu veranschaulichende Knotenregionen:

A – Augenregion: Dorsal bis ventral um den vorderen Augenrand; in der Regel viele Knoten bei geschlechtsreifen männlichen Kontroll-exemplaren; bei weiblichen Kontroll-exemplaren nicht präsent; in der Regel paarweises Auftreten (jeweils ein Knoten in der Nähe des Auges) bzw. Einzelvorkommen bei androgen-exponierten weiblichen Tieren.

B – Nasenregion zwischen Nasengruben (Sensorialporen): bei männlichen Kontroll-exemplaren in der Regel paarweises Auftreten in stärkerer Ausprägung (2 – vergrößert - oder 3 – stark ausgeprägt); bei weiblichen Kontroll-exemplaren nicht präsent, jedoch vereinzelt Vorkommen bei androgen-exponierten weiblichen Tieren.

C – Nasenregion unmittelbar vor den Nasengruben, parallel zum Maul: In der Regel vergrößert oder stark ausgeprägt bei männlichen Kontroll-exemplaren; bei weniger entwickelten männlichen Tieren oder androgen-exponierten weiblichen Tieren präsent oder vergrößert.

D – Maulregion (entlang der Maullinie): Bei männlichen Kontroll-exemplaren in der Regel ausgeprägt; bei weiblichen Kontroll-exemplaren nicht präsent; bei androgen-exponierten weiblichen Tieren können jedoch Knoten vorkommen.

E – Unterkieferregion (nahe am Maul): gewöhnlich klein und gepaart; bei männlichen Kontroll- oder exponierten Fischen unterschiedlich ausgeprägt.

F – Rumpfregion (ventral zu E): In der Regel klein und gepaart; bei männlichen Kontroll-exemplaren und androgen-exponierten weiblichen Tieren präsent.

LITERATUR

- (1) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, M.E.. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, E.L. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., Ankley, G.T.. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl, M.D., Jensen, K.M., Korte, J.J., Ankley, G.T. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith, R.J.F. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Vorlage - Laichknoteneinstufung

ID _____

Datum _____

Gesamtbewertung _____

Einstufung

1 – präsent

2 – vergrößert

3 – ausgeprägt

	A	X1	X1	X1	X1
--	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	B	X1	X1	X1	X1
--	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	C	X1									
	D	X1									

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

Anlage 5B

BEWERTUNG DER SEKUNDÄREN GESCHLECHTSMERKMALE BEI JAPANISCHEN REISKÄRPFINGEN ZUM NACHWEIS BESTIMMTER CHEMIKALIEN MIT ENDOKRINER WIRKUNG

Im Folgenden wird die Messung von Papillenprozessen* als sekundären Geschlechtsmerkmalen Japanischer Reiskarpfinge (*Oryzias latipes*) beschrieben.

* Zu Papillenprozessen kommt es in der Regel nur bei adulten männlichen Tieren; betroffen sind Flossenstrahlen ab dem zweiten bis zum siebten oder achten Strahl, gezählt ab dem hinteren Ende der Afterflosse (Abb. 1 und 2). Am ersten Flossenstrahl (gezählt ab dem hinteren Ende der Afterflosse) kommen die Papillenprozesse selten vor. Das nachstehend beschriebene Standardarbeitsverfahren (SOP) umfasst die Messung von Prozessen am ersten Flossenstrahl (bei diesem SOP ab dem hinteren Ende der Afterflosse gezählt).

(1) Nach Ausräumung der Leber (Anlage 6) den Fisch in ein konisches Rohr mit etwa 10 ml 10%igem neutral gepuffertem Formalin legen (Kopf nach oben, Schwanz nach unten). Wenn die Gonaden in einer anderen Lösung als 10 %igem neutral gepuffertem Formalin fixiert werden, den Körper zwischen dem vorderen Bereich der Afterflosse und dem After mit einer Rasierklinge transversal durchtrennen, ohne die Genitalpapillen und die eigentlichen Gonaden zu beschädigen (Abb. 3). Den Fisch mit der kranialen Seite in die Fixierlösung legen, um die Gonaden zu konservieren; die Schwanzseite in die 10 %ige neutral gepufferte Formalinlösung legen (s. o.).

(2) Nach Einlegen des Fisches in 10%iges neutral gepuffertes Formalin den vorderen Bereich der Afterflosse mit einer Pinzette fassen und für etwa 30 Sekunden spreizen, um die Afterflosse offen zu halten. Beim Greifen mit einer Pinzette einige Flossenstrahlen im vorderen Bereich vorsichtig mitfassen, um Kratzer auf den Papillen zu vermeiden.

(3) Nach dem Spreizen der Afterflosse für etwa 30 Sekunden den Fisch bis zur Messung der Papillenprozesse in 10 %igem neutral gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur aufbewahren. (Die Messung frühestens nach 24-stündiger Fixierung vornehmen.)

Messung

(1) Nach Fixieren des Fischkörpers in 10 %iger neutral gepuffertem Formalinlösung für mindestens 24 Stunden die Körper aus dem konischen Rohr nehmen; das Formalin mit Filterpapier (oder Papiertüchern) abtupfen.

(2) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben legen. Die Afterflosse mit einer kleinen Sezierschere vorsichtig abtrennen (vorzugsweise mit etwas Pterygiophorgewebe).

(3) Den vorderen Teil der abgetrennten Afterflosse mit einer Pinzette aufnehmen und mit einigen Tropfen Wasser auf einem Glasträger fixieren. Die Afterflosse mit einem Deckglas abdecken. Beim Fassen mit der Pinzette darauf achten, dass die Papillen nicht zerkratzt werden.

(4) Die verbundenen Flossenplatten mit Papillenprozessen mit Hilfe des Zählers unter einem Biomikroskop (aufrechtes oder Inversmikroskop) zählen. Papillenprozesse liegen vor, wenn am hinteren Rand der verbundenen Platte kleine Papillenbildungen zu erkennen sind. Die Zahl der verbundenen Platten mit Papillenprozessen für jeden einzelnen Flossenstrahl auf dem Arbeitsblatt vermerken (z. B. erster Flossenstrahl: 0, zweiter Flossenstrahl: 10, dritter Flossenstrahl: 12 usw.); die Summe dieser Zahlen, aufgeschlüsselt nach Fischen, in den Excel-Kalkulationsbogen eingetragen. Falls erforderlich, die Afterflosse fotografieren und die Zahl der verbundenen Flossenplatten mit Papillenprozessen auf dem Foto ermitteln.

(5) Nach der Messung die Afterflosse zur Konservierung und Aufbewahrung in das unter Nummer 1 beschriebene konische Rohr legen.

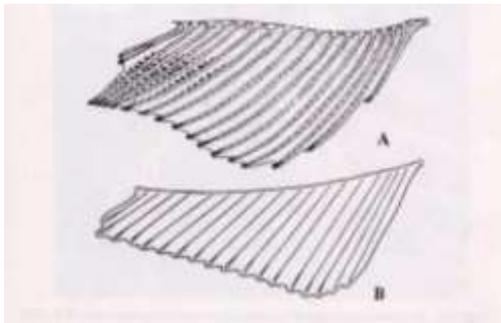


Abb. 1: Schaubild zur Veranschaulichung der an Form und Größe der Afterflosse erkennbaren Geschlechtsunterschiede; A - männlich; B - weiblich. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

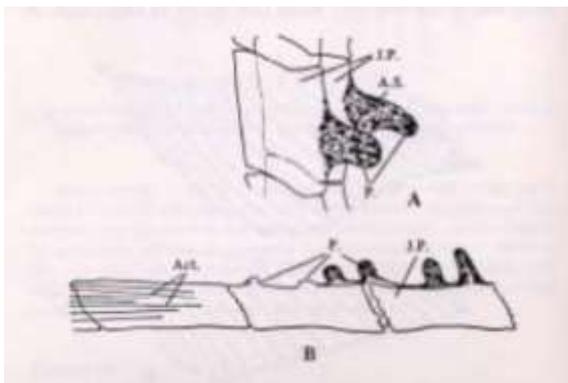


Abb. 2: A - Prozesse auf verbundenen Afterflossenplatten. J.P., verbundene Platte; A.S., axialer Bereich; P., Prozess. B - Distales Ende des Flossenstrahls; Actinotrichien (Act.) an der Spitze; Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

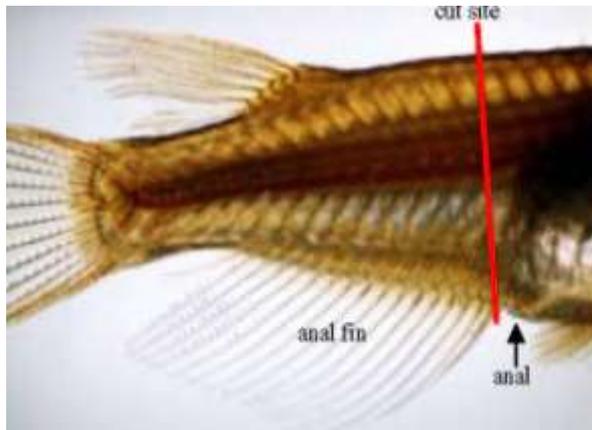


Abb. 3: Foto eines Fischkörpers mit Schnittstelle bei Fixierung der Gonaden in einer anderen Fixierlösung als 10 %iges neutral gepuffertes Formalin; in diesem Fall wird der restliche Körper zwischen der vorderen Region der Afterflosse und dem After mit einer Rasierklinge (rote Linie) abgetrennt; die Kopfseite des Fisches wird in die Fixierlösung für Gonaden, die Schwanzseite in 10 %iges neutral gepuffertes Formalin gelegt.

Anlage 6

EMPFOHLENE VERFAHREN FÜR DIE ENTNAHME VON PROBEN FÜR DIE VITELLOGENIN-ANALYSE

Es ist darauf zu achten, dass es nicht zu Kreuzkontaminationen zwischen den VTG-Proben männlicher und weiblicher Tiere kommt.

Verfahren 1A: Dickkopfritze, Blutentnahme aus der Schwanzvene/-arterie

Nach der Betäubung den Schwanzansatz mit einem Skalpell teilweise durchtrennen und mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzvene/-arterie Blut entnehmen. Nach der Blutentnahme das Plasma schnell durch 3-minütige Zentrifugierung mit 15 000 g (bzw. alternativ 10 min. mit 15 000 g bei einer Temperatur von 4 °C) isolieren. Soweit erwünscht, kann nach der Zentrifugierung der Hämatokritwert (in %) ermittelt werden. Anschließend das Plasma aus dem Mikrohämatokrit-Röhrchen entnehmen und in einem Zentrifugenröhrchen mit 0,13 Einheiten Aprotinin (einem Protease-Inhibitor) bei -80 °C aufbewahren, bis die VTG-Konzentration bestimmt werden kann. Je nach (geschlechtsabhängiger) Größe der Dickkopfritze können pro Fisch in der Regel 5-60 µl Plasma entnommen werden (Jensen *et al.* 2001).

Verfahren 1B: Dickkopfritze, Blutentnahme aus dem Herzen

Alternativ kann Blut auch durch Herzpunktion mittels heparinierter Spritze (1000 Einheiten Heparin pro ml) entnommen werden. Das Blut anschließend in Eppendorf-Röhrchen (auf Eis) geben und zentrifugieren (5 min, 7000 g, Raumtemperatur). Das Plasma in saubere Eppendorf-Röhrchen füllen (in Aliquoten, wenn das Plasmavolumen dies zulässt), umgehend auf -80 °C einfrieren und bis zur Analyse aufbewahren (Panter *et al.*, 1998).

Verfahren 2A: Japanische Reiskarpflinge, Exzision der Leber

Entnahme der Testfische aus dem Prüfbecken

- (1) Testfische mit dem kleinen Löffelsieb aus dem Prüfbecken nehmen. Dabei darauf achten, dass die Fische nicht in andere Becken fallen.
- (2) Die Fische grundsätzlich in nachstehender Reihenfolge entnehmen: Kontrolle, (gegebenenfalls) Lösungsmittelkontrolle, niedrigste Konzentration, mittlere Konzentration, höchste Konzentration. Außerdem aus einem Prüfbecken zunächst alle männlichen Tiere entnehmen, dann die weiblichen.

- (3) Anhand der äußerlichen (sekundären) Geschlechtsmerkmale (z. B. Form der Afterflosse) das Geschlecht der Fische bestimmen.
- (4) Die Testfische in ein Transportbehältnis setzen und zur Exzision der Leber an einen Arbeitsplatz bringen. Die Beschriftung des Prüfbeckens und des Transportbehältnisses auf Genauigkeit überprüfen, um sicherzustellen, dass die Zahl der aus dem Prüfbecken entnommenen Fische mit der Zahl der noch darin verbliebenen Fische übereinstimmt.
- (5) Kann das Geschlecht anhand des äußerlichen Merkmale nicht bestimmt werden, alle Fische aus dem Prüfbecken entnehmen. In diesem Fall das Geschlecht durch Sichtprüfung der Gonaden oder der sekundären Geschlechtsmerkmale unter einem Stereomikroskop bestimmen.

Exzision der Leber

- (1) Die Testfische aus dem Transportbehältnis nehmen und mit dem kleinen Löffelsieb in die Betäubungslösung setzen.
- (2) Nach dem Betäuben den Testfisch mit einer (handelsüblichen) Pinzette auf Filterpapier (oder ein Papiertuch) legen. Dabei die Pinzette beidseitig am Kopf ansetzen, damit der Schwanz nicht bricht.
- (3) Die Oberfläche des Fisches mit Filterpapier (oder einem Papiertuch) trockentupfen.
- (4) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben legen. Mit einer kleinen Sezierschere zwischen ventralem Halsbereich und Bauchmitte einen kleinen transversalen Einschnitt vornehmen.
- (5) Die Sezierschere in diesen kleinen Einschnitt einführen und den Bauch auf ein kaudal zum Kiemenbogen angesetzten Schnittlinie entlang der Bauchmittellinie bis hin zur kranialen Seite des Afters öffnen. Um Leber und Gonaden nicht zu beschädigen, die Sezierschere nicht zu tief einführen.
- (6) Unter dem Stereomikroskop folgende Schritte vornehmen:
- (7) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben auf das Papiertuch (oder eine gläserne Petrischale oder einen Glasträger) legen.
- (8) Die Wände der Bauchhöhle mit Präzisionspinzetten spreizen und die inneren Organe freilegen. Falls erforderlich, kann dazu eine Seite der Bauchhöhle entfernt werden.
- (9) Den anhaftenden Teil der Leber und der Gallenblase mit einer weiteren Präzisionspinzette freilegen. Den Gallengang fassen und die Gallenblase abtrennen. Dabei darauf achten, dass letztere nicht beschädigt wird.

- (10) Die Speiseröhre fassen, und auf die gleiche Weise den Magen-Darm-Trakt von der Leber abtrennen. Darauf achten, dass kein Magen-Darm-Inhalt austritt. Den Magen-Darm-Trakt schwanzseitig vom After trennen und aus der Bauchhöhle nehmen.
- (11) Fett und sonstiges Gewebe um die Leber entfernen. Die Leber darf dabei nicht beschädigt werden.
- (12) Den Leberausgang mit der Präzisionspinzette fassen und die Leber aus der Bauchhöhle entnehmen.
- (13) Die Leber auf den Glasträger legen. Mit der Präzisionspinzette erforderlichenfalls Fett und sonstiges externes Gewebe (z. B. Bauchfell) von der Leberoberfläche entfernen.
- (14) Das Gewicht der Leber mit einem 1,5-ml-Mikroröhrchen (Leergewicht) und einer elektronischen Analysewaage bestimmen. Den Messwert in das Arbeitsblatt eintragen (auf 0,1 mg genau). Mit den Angaben auf dem Etikett des Mikroröhrchens abgleichen.
- (15) Das Mikroröhrchen mit der Leber verschließen und in ein Kühlgestell (oder ein Eis-Rack) setzen.
- (16) Nach Exzision einer Leber die Sezierungsinstrumente reinigen oder wechseln.
- (17) Die Lebern aller Fische im Transportbehältnis entnehmen, wie oben beschrieben.
- (18) Nach Exzision der Lebern aller Fische im Transportbehältnis (d. h. aller männlichen oder allen weiblichen Tieren in einem Prüfbecken) die Leberproben in ein etikettiertes Reagenzglasgestell setzen und in einen Gefrierschrank stellen. Sind die Lebern kurz nach der Exzision einer Vorbehandlung zu unterziehen, die Proben in einem Kühlgestell (oder Eis-Rack) zum nächsten Arbeitsplatz bringen.

Nach Exzision der Lebern steht der Fischkörper zur Messung der sekundären Geschlechtsmerkmale zu Verfügung.

Leberproben

Die von den Testfischen entnommenen Leberproben bei ≤ -70 °C lagern, sofern sie nicht kurz nach der Exzision vorbehandelt werden sollen.

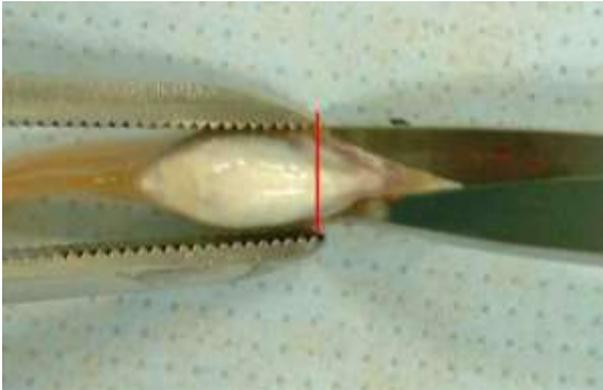


Abb. 1
Unmittelbar vor den Brustflossen einen Schereneinschnitt vornehmen.



Abb. 2
Auf der Bauchmittellinie bis zu einem Punkt etwa 2 mm kranial vor dem After einen Scherenschnitt durchführen.



Abb. 3
Die Bauchwände mit einer Pinzette spreizen, um die Leber und die anderen inneren Organe freizulegen. (Alternativ können die Bauchwände seitlich festgesteckt werden.)

Der Pfeil zeigt auf die Leber.



Abb. 4
Die Leber grob sezieren und mit einer Pinzette entnehmen.



Abb. 5
Darm mit der Pinzette vorsichtig herausziehen.



Abb. 6
Beide Darmenden und etwaiges mesenteriales Gewebe mit einer Schere durchtrennen.



Abb. 7 (Weibchen)

Das Verfahren ist bei männlichen und weiblichen Fischen dasselbe.



Abb. 8

Verfahren abgeschlossen.

Verfahren 2B: Japanische Reiskärpflinge (*Oryzias latipes*), Vorbehandlung der Leber für die Vitellogenin-Analyse: Die Flasche mit dem Homogenatpuffer aus dem ELISA-Kit nehmen und mit zerstoßenem Eis kühlen (Temperatur der Lösung: ≤ 4 °C). Wird Homogenatpuffer aus dem EnBio-ELISA verwendet, die Lösung zunächst bei Raumtemperatur auftauen und die Flasche anschließend auf zerstoßenem Eis kühlen.

Das Volumen des Homogenatpuffers für die Leber richtet sich nach dem Lebergewicht. (pro mg Leber je 50 μ l Homogenatpuffer.) Wiegt die Leber beispielsweise 4,5 mg, so beträgt das Volumen des Homogenatpuffers 225 μ l. Die Volumina der Homogenatpuffer für sämtliche Lebern in einer Liste erfassen.

Vorbereitung der Lebern zur Vorbehandlung

- (1) Das 1,5-ml-Mikroröhrchen mit der Leber erst unmittelbar vor der Vorbehandlung aus dem Gefrierschrank nehmen.
- (2) Um Vitellogenin-Kontaminationen zu vermeiden, die Lebern männlicher Fische vor den Lebern der weiblichen Fische vorbehandeln. Die Vorbehandlung der Testgruppen sollte zudem in der folgenden Reihenfolge ablaufen: Kontrolle, (gegebenenfalls) Lösungsmittelkontrolle, niedrigste Konzentration, mittlere Konzentration, höchste Konzentration.
- (3) Aus dem Gefrierschrank immer nur so viel 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Leberproben entnehmen, wie auch gleichzeitig zentrifugiert werden können.
- (4) Die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit den Leberproben in der Reihenfolge der Nummern der Proben aus dem Eis-Rack anordnen. (Die Lebern brauchen nicht aufgetaut zu werden.)

Vorbehandlung

1. Zugabe des Homogenatpuffers

- (1) Nachdem anhand der Liste geprüft wurde, welches Volumen des Homogenatpuffers jeweils für ein Leberpräparat zu verwenden ist, die Mikropipette (Volumenbereich 100-1000 μ l) auf das entsprechende Volumen einstellen. Eine saubere Spitze aufsetzen.
- (2) Homogenatpuffer aus der Reagenzflasche entnehmen und in die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Leber geben.
- (3) Homogenatpuffer allen leberhaltigen 1,5-ml-Mikroröhrchen wie oben beschrieben zugeben. Die Spitze der Mikropipette braucht nicht gewechselt zu werden. Ist die Spitze jedoch verunreinigt oder wird vermutet, dass sie verunreinigt ist, muss sie

jedoch ausgewechselt werden.

2. Homogenisieren der Leber

- (1) Am Homogenisator ein neues Pistill befestigen.
- (2) Das Pistill in das 1,5-ml-Mikroröhrchen einführen. Dabei den Mikroröhrchen-Homogenisator so halten, dass die Leber zwischen Pistill-Oberfläche und innere Wand des 1,5-ml-Mikroröhrchens gedrückt wird.
- (3) Den Mikroröhrchen-Homogenisator für 15-20 Sekunden bedienen. Danach das 1,5-ml-Mikroröhrchen auf zerstoßenem Eis abkühlen.
- (4) Das Pistill aus dem 1,5-ml-Mikroröhrchen nehmen und die Probe etwa 10 Sekunden ruhen lassen. Anschließend eine Sichtprüfung der Suspensionszustands vornehmen.
- (5) Sind Leberstückchen in der Suspension zu erkennen, die Schritte (3) und (4) wiederholen, um ein zufriedenstellendes Leberhomogenat zu erhalten.
- (6) Das suspendierte Leberhomogenat bis zum Zentrifugieren auf dem Eis-Rack abkühlen.
- (7) Das Pistill bei jedem neuen Homogenat auswechseln.
- (8) Alle Lebern mit dem Homogenatpuffer homogenisieren, wie oben beschrieben.

3. Zentrifugen des suspendierten Leberhomogenats

- (1) Sicherstellen, dass die gekühlte Zentrifugierkammer eine Temperatur von ≤ 5 °C aufweist.
- (2) Die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit dem suspendierten Leberhomogenat in die gekühlte Zentrifuge stellen (erforderlichenfalls nach einer Ausbalancierung).
- (3) Das suspendierte Leberhomogenat für 10 Minuten bei einer Temperatur von ≤ 5 °C mit 13 000 g zentrifugieren. Wird der Überstand in geeigneter Weise abgetrennt, können Zentrifugalkraft und Zeitdauer jedoch nach Bedarf eingestellt werden.
- (4) Nach der Zentrifugierung kontrollieren, ob der Überstand angemessen abgetrennt wurde (Oberfläche: lipid; Zwischenschicht: Überstand, untere Schicht: Lebergewebe). Bei unangemessener Trennung die Suspension unter denselben Bedingungen erneut zentrifugieren.
- (5) Alle Proben aus der gekühlten Zentrifuge nehmen und in der Reihenfolge der Nummern der Proben auf dem Eis-Rack anordnen. Dabei darauf achten, dass die

getrennten Schichten nach dem Zentrifugen nicht resuspendieren.

4. Entnahme des Überstands

- (1) Vier 0,5-ml-Mikroröhrchen zur Entnahme des Überstands in das Reagenzglasgestell setzen.
- (2) Jeweils 30 µl Überstand (als Zwischenschicht abgetrennt) mit der Mikropipette entnehmen und in eines der 0,5-ml-Mikroröhrchen geben. Dabei darauf achten, dass kein Lipidmaterial (Oberfläche) oder Lebergewebe (untere Schicht) aufgenommen werden.
- (3) Den Überstand entnehmen und wie oben beschrieben in zwei weitere 0,5-ml-Mikroröhrchen dispensieren.
- (4) Übrigen Überstand mit der Mikropipette entnehmen (möglichst ≥ 100 µl) und in das verbleibende 0,5-ml-Mikroröhrchen geben. Dabei darauf achten, dass kein Lipidmaterial (Oberfläche) oder Lebergewebe (untere Schicht) aufgenommen wird.
- (5) Das 0,5-ml-Mikroröhrchen verschließen und auf dem Etikett das Volumen des Überstands notieren. Danach die Mikroröhrchen sofort auf dem Eis-Rack kühlen.
- (6) Für jeden Überstand die Spitze der Mikropipette wechseln. Haftet sehr viel Lipidmaterial an der Spitze an, die Spitze umgehend auswechseln, um den das Leberextrakt nicht mit Fett zu kontaminieren.
- (7) Den gesamten zentrifugierten Überstand wie oben beschrieben in vier 0,5-ml-Mikroröhrchen geben.
- (8) Danach alle etikettierten Mikroröhrchen in das Reagenzglasgestell setzen und im Gefrierfach einfrieren. Werden die VTG-Konzentrationen unmittelbar nach der Vorbehandlung gemessen, ein 0,5-ml-Mikroröhrchen (mit 30 µl des Überstands) im Reagenzglasgestell abkühlen und an den Arbeitsplatz bringen, an dem der ELISA durchgeführt werden soll. In diesem Fall die übrigen Mikroröhrchen in die Reagenzglasgestelle setzen und im Gefrierschrank einfrieren.
- (9) Nach Entnahme des Überstands den verbleibenden Rückstand angemessen entsorgen.

Lagerung der Probe

Die 0,5-ml-Mikroröhrchen mit dem Überstand des Leberhomogenats bis zur Durchführung des ELISA bei ≤ -70 °C lagern.

Verfahren 3A: Zebraabärblinge, Blutentnahme aus der Schwanzvene/-arterie

Unmittelbar nach der Betäubung den Schwanzansatz mit einem Skalpell teilweise durchtrennen und mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzvene/-arterie Blut entnehmen. Die Blutvolumen betragen je nach Größe der Fische 5 bis 15 μl . In das Mikrokapillarrohr die gleiche Menge Aprotininpuffer (6 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) geben, und das Plasma durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 600 g) vom Blut trennen. Das Plasma in den Teströhrchen auffangen und bis zur Bestimmung der Vitellogenin-Konzentration oder anderer relevanter Proteine bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

Verfahren 3B: Zebrabärblinge, Blutentnahme durch Herzpunktion

Um eine Koagulierung des Bluts und einen Proteinabbau zu vermeiden, die Proben mit heparinisierte (1000 Einheiten/ml) phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und dem Proteasehemmer Aprotinin (2 TIU/ml) entnehmen. Als Pufferbestandteile werden Heparin, Ammoniumsalz und lyophilisiertes Aprotinin, für die Blutentnahme Spritzen (1 ml) mit fixierter dünner Nadel (z. B. Braun Omnikan-F) empfohlen. Die Spritze muss mit der Pufferlösung vorgefüllt sein (ca. 100 μl), damit die geringen Blutvolumina der einzelnen Fische vollständig eluiert werden können. Die Blutproben durch Herzpunktion entnehmen. Dazu die Fische zunächst mit MS-222 (100 mg/l) betäuben. Bei angemessener Betäubung ist der Herzschlag der Zebrabärblinge wahrnehmbar. Beim Punktieren des Herzens den Spritzenkolben unter leichter Spannung halten. Die zu entnehmendem Blutvolumina liegen zwischen 20 und 40 μl . Nach der Herzpunktion das Blut-/Puffer-Gemisch in die Teströhrchen geben. Das Plasma durch Zentrifugieren (20 min mit 5000 g) vom Blut trennen und bis zur Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

Verfahren 3C: Standardarbeitsverfahren (SOP): Zebrabärblinge, Homogenisierung von Kopf- und Schwanzgewebe

- (1) Die Fische betäuben und töten, wie für den Test beschrieben.
- (2) Kopf und Schwanz der Fische abtrennen, siehe Abbildung 1.

Wichtig: Alle Sezierinstrumente und das Sezierbrett sind nach jedem Fisch abzuspülen und ordnungsgemäß zu reinigen (z. B. mit 96 %igem Ethanol), um VTG-„Kontaminationen“ nicht induzierter Männchen durch weibliche Fische oder induzierte Männchen zu vermeiden.

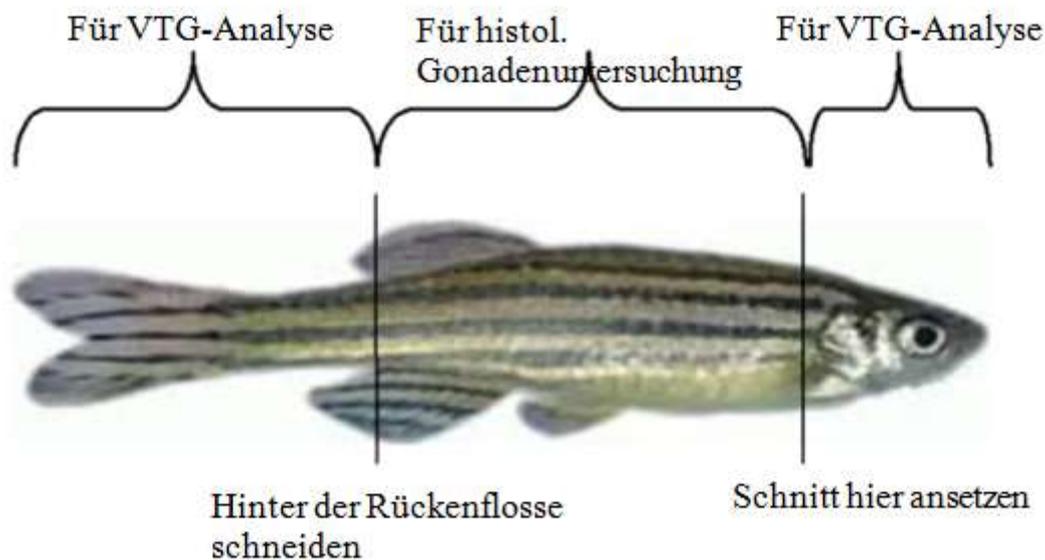


Abbildung 1

- (3) Das Gewicht der gepoolten Kopf- und Schwanzteile auf 1 mg genau abmessen.
- (4) Nach dem Wiegen die Teile in geeignete Röhrchen (z. B. 1,5 ml Eppendorf) geben und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Homogenisierung einfrieren oder unmittelbar mit zwei Kunststoff-Pistillen auf Eis homogenisieren. (Alternativ können auch andere Methoden angewendet werden, sofern sie auf Eis durchgeführt werden und eine homogene Masse entsteht.) Wichtiger Hinweis: Die Röhrchen sind ordnungsgemäß zu nummerieren, damit die Kopf- und Schwanzteile für die histologische Gonadenuntersuchung dem jeweiligen Rumpf zugeordnet werden können.
- (5) Nach Herstellung einer homogenen Masse das Vierfache des Gewebegewichts des eisgekühlten Homogenisierungspuffers* hinzugeben. Mit den Pistillen weiterarbeiten, bis eine homogene Mischung entsteht. Wichtiger Hinweis: Für jeden Fisch ist ein frisches Pistill zu verwenden.
- (6) Die Proben bis zur Zentrifugierung ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50000 g, 30 Minuten) auf Eis legen.
- (7) Mit einer Pipette 20 μl -Portionen des Überstands in mindestens zwei Röhrchen geben; dabei die Spitze der Pipette durch die oberflächige Fettschicht führen und den Überstand vorsichtig ansaugen, ohne jedoch Fett- oder Pelletfraktionen mitaufzunehmen.
- (8) Die Röhrchen bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

***Homogenisierungspuffer:**

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; Proteasehemmer-Cocktail (1 %) (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Proteasehemmer-Cocktail.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) z. B. Bie & Berntsen, Dänemark.
- Proteasehemmer-Cocktail: Sigma (Säugetiergewebe) Produktnummer P 8340.
- HINWEIS: Der Homogenisierungspuffer ist am Tag der Herstellung zu verbrauchen. Während der Verwendung muss die Pufferlösung auf Eis liegen.

Anlage 7

VITELLOGENIN-ANGEREICHERTE PROBEN UND INTER-ASSAY-REFERENZSTANDARD

An jedem Tag, an dem Vitellogenin-Bestimmungen vorgenommen werden, ist eine nach einem Inter-Assay-Referenzstandard hergestellte Anreicherungsprobe zu analysieren. Das für den Inter-Assay-Referenzstandard verwendete Vitellogenin muss aus einer anderen Charge als das Vitellogenin stammen, das zur Herstellung der Kalibrierstandards für den durchzuführenden Assay verwendet wurde.

Die Anreicherungsprobe wird hergestellt, indem eine bekannte Menge des Inter-Assay-Standards einer Plasmaprobe männlicher Kontrollfische zugegeben wird. Die Probe anreichern, bis eine Vitellogenin-Konzentration erreicht wird, die 10- bis 100-mal höher ist als die bei männlichen Kontrollfischen erwartete VTG-Konzentration. Die so angereicherte Probe kann von einem einzelnen Fisch oder von mehreren Fischen stammen.

In mindestens zwei Mulden eine Teilprobe nicht angereicherten Plasmas männlicher Kontrolltiere analysieren. Die angereicherte Probe auch in mindestens zwei Duplikatmulden analysieren. Die mittlere VTG-Menge in den beiden nicht angereicherten Plasmaproben männlicher Kontrollfische der berechneten Vitellogenin-Menge hinzurechnen, die zur Anreicherung der Proben zugegeben wurde, um die erwartete Konzentration zu bestimmen. Das Verhältnis dieser erwarteten zur gemessenen Konzentration zusammen mit den Ergebnissen der an dem betreffenden Tag durchgeführten Assays protokollieren.

Anlage 8

FLUSSDIAGRAMM ALS ENTSCHEIDUNGSHILFE FÜR DIE STATISTISCHEN ANALYSE

