DIN EN ISO 19040-3

DIN

ICS 13.060.70

Einsprüche bis 2022-09-29

Entwurf

Wasserbeschaffenheit – Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser – Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen (ISO 19040-3:2018); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 19040-3:2022

Water quality –
Determination of the estrogenic potential of water and waste water –
Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay (ISO 19040-3:2018);
German and English version prEN ISO 19040-3:2022

Qualité de l'eau –
Détermination du potentiel oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires –
Partie 3: Essai in vitro sur cellules humaines avec gène rapporteur (ISO 19040-3:2018);
Version allemande et anglaise prEN ISO 19040-3:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-07-29 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

— vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;

— oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;

— oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 96 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 19040-3:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ als prEN ISO 19040-3:2022 übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119–01–03–05–09 AK „Hormonelle Wirkungen (Xenohormone)“ des Arbeitsausschusses NA 119–01–03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser — Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen (T 9):

Verfahren DIN EN ISO 19040-3 —T 9

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5667-16	siehe	DIN EN ISO 5667-16
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 6107-6:2004	siehe	DIN ISO 6107-6:2017-11
ISO 7405:2008*	siehe	DIN EN ISO 7405:2009-06*
ISO 11074:2015	siehe	DIN EN ISO 11074:2015-11
ISO 15839:2003	siehe	DIN EN ISO 15839:2007-02
ISO 20079:2005	siehe	DIN EN ISO 20079:2006-12
ISO 21427-2:2006	siehe	DIN EN ISO 21427-2:2009-08

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

* Die Norm wurde inzwischen zurückgezogen und durch ISO 7405:2018 bzw. DIN EN ISO 7405:2019-03 ersetzt.

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) —gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser —Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen (T 9).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung* sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

DIN EN ISO 7405:2009-06, *Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO 7405:2008); Deutsche Fassung EN ISO 7405:2008*

DIN EN ISO 15839:2007-02, *Wasserbeschaffenheit — Online-Sensoren/Analysengeräte für Wasser — Spezifikationen und Leistungsprüfungen (ISO 15839:2003); Deutsche Fassung EN ISO 15839:2006*

DIN EN ISO 20079:2006-12, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (Lemna minor) — Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005); Deutsche Fassung EN ISO 20079:2006*

DIN EN ISO 21427-2:2009-08, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest — Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie (ISO 21427-2:2006); Deutsche Fassung EN ISO 21427-2:2009*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 6107-6:2017-11, *Wasserbeschaffenheit — Wörterbuch — Teil 6 (ISO 6107-6:2004); Text Deutsch, Englisch, Französisch und Russisch*

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

– Entwurf –

Mai 2022

prEN ISO 19040-3

Wasserbeschaffenheit – Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser – Teil 3: In vitro-Reportergentest mit humanen Zellen (ISO 19040-3:2018)

Water quality – Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay (ISO 19040-3:2018)

Qualité de l'eau – Détermination du potentiel oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires – Partie 3: Essai in vitro sur cellules humaines avec gène rapporteur (ISO 19040-3:2018)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 4
Vorwort 5
1 Anwendungsbereich 6
2 Normative Verweisungen 6
3 Begriffe 6
4 Störungen 9
5 Grundlage des Verfahrens 9
6 Geräte und Materialien 9
7 Reagenzien, Zellen und Medien 10
8 Probenahme und Proben 14
8.1 Allgemeines 14
8.2 Flaschen und Materialien für die Probenahme 14
8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme 14
8.4 Probenahmeverfahren 14
8.5 Probentransport 14
8.6 Vorbehandlung der Probe 15
8.7 Lagerung der Proben 15
9 Testverfahren 15
9.1 Erhaltung der Zellkultur 15
9.1.1 Einfrieren der Zellen 15
9.1.2 Ansetzen einer neuen Zellkultur 16
9.1.3 Kultivierung der Zellen 16
9.2 Reportergen-Testverfahren mit humanen Zellen 16
9.2.1 Impfen der Zellen (Tag 1) 16
9.2.2 Herstellung der E2-Referenz (Tag 2) 17
9.2.3 Herstellung der Probenverdünnungen (Tag 2) 17
9.2.4 Feldblindwert 18
9.2.5 Exposition der Zellen (Tag 2) 18
9.2.6 Ernten der Zellen (Tag 3) 18
9.2.7 Messung der Lumineszenz (Tag 3) 19
9.3 Datenauswertung 19
9.3.1 Berechnung der Reportergeninduktion 19
9.3.2 Berechnung des Prozentsatzes der maximalen Wirkung 19
9.3.3 Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve 20
10 Gültigkeitskriterien 20
10.1 Gültigkeitskriterien für den Test 20
10.2 Gültigkeitskriterien für die Proben 20
11 Bewertungskriterien 21
12 Untersuchungsbericht 21
Anhang A (informativ) Konfiguration des Luminometers 22
Anhang B (informativ) Testplattenbelegung 23
Anhang C (informativ) Eigenschaften und Einzelheiten des Biotests 24
Anhang D (informativ) Testung von Chemikalien und Extrakten 26
D.1 Allgemeines 26
D.2 Extraktion von Wasserproben 26
D.3 Test mit verdünnten organischen Lösungen oder Extrakten 26
D.4 Daten aus der Literatur 26
Anhang E (informativ) Herstellung von Verdünnungsreihen 28
Anhang F (informativ) Verfahrenskenndaten 29
F.1 Beschreibung des Ringversuchs 29
F.1.1 Allgemeines 29

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

F.1.2 Beschreibung der Proben und teilnehmende Laboratorien 29
F.1.3 Zusammenfassung der 17β-Estradioläquivalentkonzentrationen (EEQ) 30
F.1.4 Zusammenfassung der geringsten, nicht wirksamen Verdünnungen LID (G-Stufe) 34
F.1.5 Richtigkeit der Ergebnisse 37
Anhang G (informativ) Statistische Bewertung 41
Anhang H (informativ) Berechnung von 17β-Estradiol-Äquivalenten 42
H.1 Allgemeines 42
H.2 Modellierung der Dosis-Wirkungsbeziehung 42
H.3 Berechnung von 17β-Estradioläquivalenten für Testproben 43
H.4 Angabe von 17β-Estradioläquivalenten für Testproben 43
Anhang I (informativ) Bestimmung der geringsten, nicht wirksamen Abwasserverdünnung (*G*-Wert) — Vereinfachte Auswertung für die Abwassertestung 44
I.1 Allgemeines 44
I.2 Prinzip 44
I.3 Herstellung von Verdünnungen zur Bestimmung des G-Wertes 44
I.4 Test zur Bestimmung des *G*-Wertes 44
I.5 Ergebnisbewertung — *G*-Wert, Abwässer 44
I.6 Dokumentation der Ergebnisse 44
Literaturhinweise 46

Bilder

Bild 1 — Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte nach der Subkultivierung 16
Bild B.1 — Testplattenbelegung für eine Probe mit 10 sukzessiven Verdünnungsstufen (in dreifacher Ausführung) 23
Bild C.1 — Testprinzip 24
Bild F.1 — Zusammenfassung der 17β-Estradiol Äquivalentkonzentrationen (EEQ) [ng/l] der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5 34
Bild F.2 — Zusammenfassung der bestimmten geringsten, nicht wirksamen Verdünnung (LID, G-Stufe) der wässrigen Proben S1, S2, S3 und S5 37
Bild F.3 — Zusammenfassung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 (ausgedrückt in absoluten Differenzen zum angenommenen Wert) 40

Tabellen

Tabelle 1 — Herstellung des Substratgemisches (1 000 ml) 13
Tabelle 2 — Zusammensetzung des Zelllyse-Gemisches (1 000 ml) 13
Tabelle 3 — Verdünnungsstufen für die Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2) 17
Tabelle 4 — Verdünnungsstufen für die Wasserproben 17
Tabelle C.1 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 25
Tabelle C.2 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 25
Tabelle C.3 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis 25
Tabelle D.1 — Zusammenfassung relativer Potenzen (P_r) im Vergleich zu 17β-Estradiol für ausgewählte Verbindungen 27
Tabelle F.1 — Beschreibung der Proben 29
Tabelle F.2 — Überblick über die Proben, die jedes Labor getestet hat 30
Tabelle F.3 — Zusammenfassung der EEQ-Ergebnisse des *In-vitro*-Reportergentest mit humanen Zellen 31
Tabelle F.4 — Zusammenfassung der geringsten, nicht wirksamen Verdünnungen (LID, *G*-Stufe) 35
Tabelle F.5 — Zusammenfassung der Schätzung der Richtigkeit für die Proben S2 und S5 38

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 19040-3:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 19040-3:2022 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 19040-3:2018 wurde von CEN als prEN ISO 19040-3:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 5, *Biological methods* erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 19040 ist auf der ISO Internetseite abrufbar.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser mittels eines Reportergen-Tests unter Verwendung stabil transfizierter, humaner Zellen fest. Dieser Reportergen-Test beruht auf der Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors alpha.

Dieses Verfahren ist anwendbar auf:

— Süßwasser;

— Abwasser;

— wässrige Extrakte und Sickerwasser;

— Eluate von Sedimenten (Süßwasser);

— Porenwasser;

— wässrige Lösungen von Einzelsubstanzen oder von chemischen Gemischen;

— Trinkwasser;

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) dieser Methode zur direkten Analyse von Wasserproben liegt zwischen 0,3 ng/l und 1 ng/l 17β-Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Diese Werte wurden in einem internationalen Ringversuch ermittelt (siehe Anhang F). Der obere Arbeitsbereich wurde bis zu einem Gehalt von 75 ng EEQ/l bewertet [basierend auf einem internationalen Ringversuch (siehe Tabelle F.3)]. Proben, die ein estrogenes Potenzial oberhalb dieser Schwelle zeigen, müssen für eine gültige Quantifizierung verdünnt werden. Eine Extraktion und Anreicherung von Wasserproben kann notwendig sein, wenn ihr estrogenes Potential unter der oben angegebenen Bestimmungsgrenze liegt.

WARNUNG —Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Spezifikation und Prüfverfahren*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: unter http://www.iso.org/obp

— IEC Electropedia: unter http://www.electropedia.org/

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

3.1
Kulturmedium
flüssige oder verfestigte Nährstoffe, die Zellwachstum fördern

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 24, modifiziert — „mikrobielles Wachstum“ durch „Zellwachstum“ ersetzt]

3.2
Verdünnungsstufe
G
Volumenverhältnis einer Mischung von Wasser oder Abwasser (mit dem Zähler 1) und dem Verdünnungswasser als ganze Zahl

Anmerkung 1 zum Begriff: Für unverdünntes Wasser oder Abwasser ist dieser Koeffizient per Definition $1 \rightarrow 1$. Der entsprechende und kleinstmögliche Wert von G ist 1. In diesem Dokument zeigt der Pfeil den Übergang vom anfänglichen Gesamtvolumen zum endgültigen Gesamtvolumen an.

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 28]

3.3
Verdünnungswasser
Wasser, welches zur Untersuchungsprobe hinzugegeben wird, um eine Serie definierter Verdünnungen herzustellen

[QUELLE: ISO 20079:2005, 3.7]

3.4
EC_{50}
Konzentration einer Verbindung, die 50 % einer Wirkung verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sinne dieses Dokuments ist der EC_{50} die Konzentration einer Verbindung, die 50 % der maximalen Reportergenaktivität induziert, die durch diese Verbindung erreicht werden kann.

3.5
Extrakt
Untersuchungsprobe nach Extraktion und eventueller Entfernung des Lösemittels

3.6
Feldblindwert
im Labor vorbereiteter mit Wasser oder anderer Blindwertmatrix befüllter Behälter, der durch das Probenahmepersonal während der Probenahme am Ort der Probenahme ausgebracht wird, um mögliche Kontaminationen während der Probenahme zu verifizieren

[QUELLE: ISO 11074:2015, 4.5.3]

3.7
Induktionsrate
Quotient zwischen dem Mittelwert der in mit Testsubstanz oder mit einer Positivkontrolle versetzten Platten gemessenen Vertiefungen einer Platte mit erhöhter Reportergenaktivität und dem Mittelwert der entsprechenden, mit einer Negativkontrolle behandelten Vertiefungen einer Platte unter Einsatz der gleichen Zellen und identischen Aktivierungsbedingungen

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 43, modifiziert — „gemessenen Vertiefungen einer Platte mit erhöhter Reportergenaktivität“ ersetzt „gezählten mutanten Kolonien“; „entsprechenden ... Vertiefungen einer Platte“ ersetzt „entsprechenden ... Platten“; „Quotient“ ersetzt „Differenz“; „der gleichen Zellen“ ersetzt „des gleichen Stamms“.]

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

3.8
Bestimmungsgrenze
LOQ (en: Limit of Quantification)
kleinster Wert eines Determinanten, der mit einem vertretbaren Niveau an Genauigkeit und Präzision bestimmt werden kann

[QUELLE: ISO 15839:2003, 3.18]

3.9
niedrigste ineffektive Verdünnung
LID (en: Lowest ineffective Dilution)/G-Stufe
niedrigste Verdünnung innerhalb einer Testreihe, die keine Wirkung zeigt, d. h. keine statistisch signifikante Zunahme der Reportergenaktivität verglichen mit der Negativkontrolle

[QUELLE: ISO 11350:2012, 3.4, modifiziert — „Anstieg der Reportergenaktivität“ ersetzt „Zunahme der Anzahl von Revertantenwells“.]

3.10
Negativkontrolle
Verdünnungswasser ohne Untersuchungsprobe

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 51]

3.11
Passagezahl
Anzahl der Subkulturen von Zellen in einem neuen Kulturgefäß (Zellkulturflasche oder Mikrotiterplatte)

3.12
Referenzverbindung
Verbindung mit einem oder mehreren Eigenschaftswerten, die ausreichend reproduzierbar quantifiziert und gut etabliert sind, um die Kalibrierung des Messverfahrens zu ermöglichen

[QUELLE: ISO 7405:2008, 3.6, modifiziert — „Verbindung“ ersetzt „Material“; „Kalibrierung des Messverfahrens“ ersetzt „Verwendung des Materials oder Stoffes für die Kalibrierung einer Apparatur, die Bewertung einer Messmethode oder die Zuordnung von Werten zu Materialien“.]

3.13
relative Lichteinheiten
RLU, en: relative light units
Maß der Reportergenaktivität durch Messung von Licht unter Verwendung eines Luminometers, angegeben als relative Lichteinheiten

3.14
Reportergenaktivität
quantitative Aktivität eines Gens, das an die Promotorsequenz eines anderen Gens fusioniert ist

3.15
Stammkultur
gefrorene Zellkultur zur Erhaltung der Eigenschaften der Zelllinie

[QUELLE: ISO 21427-2:2006, 13, modifiziert — „Zelllinie” ersetzt „V79-Zellen“]

3.16
Subkultivierung
Überführung eines Teils einer Zellkultur in ein neues Zellkulturgefäß während einer Zellkultivierung

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

3.17
Testprobe
unverdünnter, verdünnter oder anderweitig behandelter Teil einer zu prüfenden Probe nach Abschluss aller Vorbereitungsschritte wie Zentrifugation, Filtration, Homogenisierung, pH-Einstellung und Bestimmung der Ionenstärke

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 92]

4 Störungen

In den Testproben vorhandene toxische Effekte können zu einer Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen und damit zu einer Verringerung der gemessenen Zellreaktion führen. Folglich können estrogene Effekte einer Probe durch akute toxische Effekte maskiert werden, was zu falsch negativen Testergebnissen führt (weitere Informationen siehe Abschnitt 9). In diesem Fall sollte die Probe soweit verdünnt werden, bis keine Zytotoxizität mehr beobachtet wird (siehe Anleitung des angewendeten Zytotoxizitätstests).

Die Verwendung unangemessener Probenahmegeräte und/oder Probenflaschen kann aufgrund der möglichen Adsorption aktiver Verbindungen auf den Oberflächen das Testergebnis beeinflussen, was zu falsch negativen Ergebnissen führt. Andererseits könnten aktive Verbindungen aus den Probenflaschen in die Probe freigesetzt werden, insbesondere bei Verwendung von Kunststoffgefäßen, und somit falsch positive Ergebnisse erzeugt werden. Weitere Informationen in Abschnitt 7.

Ein hoher Salzgehalt kann aufgrund des resultierenden osmotischen Drucks toxische Effekte verursachen. Die ER(α) CALUX-Zellen (Literaturhinweise [10] bis [16]) tolerieren eine Leitfähigkeit der Probe bis zu 34 000 µS/cm (1,0 % m/m Salzgehalt). Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen können die Reaktion der Zellen negativ beeinflussen. Aus diesem werden dem Zellkulturmedium Antibiotika zugesetzt. Die Kontamination der Zellen wird beim Testen der Probe durch visuelle Beobachtung (Mikroskop) beurteilt. Weitere Informationen in Abschnitt 9.

Wenn gefilterte Proben getestet werden, um Bakterien aus der Probe zu entfernen, werden auch feste Partikel von der Probe abgetrennt. Daher können Substanzen mit estrogener Aktivität, die an Partikel adsorbiert sind, möglicherweise nicht detektiert werden.

Anti-estrogene Verbindungen und andere nichttoxische Hemmstoffe können estrogene Wirkungen maskieren. Das Vorhandensein von Störverbindungen kann mittels Proben beurteilt werden, die mit einer bestimmten Menge an estrogenen Verbindungen mit definierten Eigenschaften (z. B. 17β-Estradiol) dotiert wurden, was zu einer bekannten Induktion des Testsystems führt.

Verbindungen mit estrogenen Eigenschaften können als inaktive Konjugate vorliegen. Eine chemische Dekonjugation kann notwendig sein, um das estrogene Gesamtpotential einer Probe quantitativ zu bestimmen.

5 Grundlage des Verfahrens

Estrogenrezeptor (ER) – vermittelte Signalübertragung ist bei der Estrogenwirkung wesentlich, und der Mechanismus der Estrogenrezeptor-Signalübertragung ist bestens bekannt. Bei der Estrogenbindung wird der Estrogenrezeptor aktiviert und lagert sich an Erkennungssequenzen in der Promoterregion der Zielgene, den sogenannten estrogen-responsiven Elementen (ERE), an. Diese ERE sind an ein Promoterelement und ein Gen zur Transkription für das leicht messbare Protein Luciferase gekoppelt. In diesen Zellen aktiviert der ligand-aktivierte Rezeptor die Luciferase-Transkription, und das transkribierte Luciferase-Protein sendet Licht aus, wenn ein Substrat hinzugegeben wird. Das Signal nimmt infolge der steigenden Ligandkonzentrationen dosisabhängig zu. Die Luciferase-Aktivität in Zelllysaten wird mit einem Luminometer gemessen, das zuverlässige, empfindliche und quantitative Messungen zulässt.

6 Geräte und Materialien

Neben der Ausstattung, die üblicherweise in einem Labor für Zellkulturen vorhanden ist, werden folgende Geräte und Materialien benötigt. Geeignete Probenahmegeräte werden in Abschnitt 8 genannt.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

6.1 **Sterile Werkbank,** Standard: „Biologische Gefährdung".

6.2 **Wasserbad,** 37 °C.

6.3 **CO_2-Inkubator,** 5 % CO_2, 37 °C, Feuchte 100 %.

6.4 **Invertes Phasenkontrastmikroskop.**

6.5 **Gefrierschrank,** mindestens ≤ −18 °C und bei ≤ −70 °C.

6.6 **Schüttelapparat für Mikrotiterplatten**.

6.7 **Zentrifuge**.

6.8 **Laborwaage**.

6.9 **Sterile Pipetten,** 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml, aus Glas oder Kunststoff.

6.10 **Pipettierhelfer.**

6.11 **Zellkulturflaschen,** 75 cm^2 mit Filterdeckel.

6.12 **Sterile Kunststoffbehälter,** 12 ml und 50 ml mit sterilem Verschluss.

6.13 **Sterile Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen in der Platte (Wells).**

6.14 **Mehrkanal-Multistepper-Pipette (Repetierpipette),** einschließlich 5-ml- und 10-ml-Spitzen.

6.15 **Pipetten,** 1 µl, 50 µl, 200 µl und 1 000 µl, mit sterilen Spitzen.

6.16 **Mehrkanalpipetten,** bis zu 50 µl und bis zu 300 µl.

6.17 **Sterile 96-Well-Platten aus Polystyren,** mit flachem, transparentem Boden und Deckel, geeignet für Zellkultur, Volumen 300 µl je Vertiefung.

6.18 **Mikrotiterplatten-Luminometer mit zwei Injektoren,** für die Zugabe des Substrats und Stoppreagens.

6.19 **Zellzähler oder Zählkammer (Hämocytometer).**

6.20 **pH-Meter.**

6.21 **Kryoröhrchen,** steril, 2 ml.

6.22 **Flüssigstickstoffbehälter für längere Aufbewahrung der Zellen**.

6.23 **Filter**, Celluloseacetat, Porengröße 0,45 µm.

7 Reagenzien, Zellen und Medien

7.1 Reagenzien

Als Reagenzien so weit wie möglich solche des Reinheitsgrades „zur Analyse" verwenden. Wenn (andere) Hydrate im Vergleich zu den festgelegten Verbindungen verwendet werden, sicherstellen, dass die richtige Masse der Hauptverbindung eingesetzt wird.

7.1.1 **Dimethylsulfoxid (DMSO)**.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

7.1.2 **Glycerin für die Molekularbiologie,** ≥ 99 %, Molekulargewicht: 92,09 g/mol, CAS-Nr.: 56-81-5.

7.1.3 **17β-Estradiol,** ≥ 98 %, ($C_{18}H_{24}O_2$), Molekulargewicht: 272,38 g/mol, CAS-Nr.: 50-28-2.

7.1.4 **Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA-Na),** CAS-Nr.: 6381-92-6.

7.1.5 **Trypsin,** CAS-Nr.: 9002-07-7.

7.1.6 **Fetales Kälberserum (FKS).**

7.1.7 **DMEM/F12-Medium mit Phenolrot als pH-Indikator.**

7.1.8 **Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x).**

7.1.9 **Penicillin-Streptomycin (100x),** verwendete Konzentration 5 000 Penicillineinheiten je ml/5 000 µg Streptomycin je ml).

7.1.10 **Phosphat-gepufferte Salzlösung pH 7,2 (phosphate buffered saline, PBS),** ohne Calcium und Magnesium.

7.1.11 **Adenosin-5'-triphosphat (ATP),** CAS-Nr.: 34369-07-8.

7.1.12 **trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Monohydrat (CDTA),** CAS-Nr.: 125572-95-4.

7.1.13 **Dithiothreitol (DTT),** CAS-Nr.: 3483-12-3.

7.1.14 **2-Amino-2-(hydroxylmethyl)propan-1,3-diol (TRIS),** CAS-Nr.: 77-86-1.

7.1.15 **Dextran T500.**

7.1.16 **Aktivkohle.**

7.1.17 **Coenzym A, als freie Säure,** CAS-Nr.: 85-61-0.

7.1.18 **D-Luciferin-Natriumsalz,** CAS-Nr.: 103404-75-7.

7.1.19 **Magnesiumhydroxidcarbonat-Pentahydrat,** $C_4H_2Mg_5O_{14}$, CAS-Nr.: 56378-72-4.

7.1.20 **Magnesiumsulfat,** CAS-Nr.: 7487-88-9.

7.1.21 **Natriumhydrogencarbonat,** CAS-Nr.: 144-55-8.

7.1.22 **Zellkulturmedium-Pulver,** Sigma, D2902, ohne Phenolrot und Natriumhydrogencarbonat.

7.1.23 **Tricin,** CAS-Nr.: 5704-04-1.

7.1.24 **Aceton,** (analysenrein), CAS-Nr.: 67-64-1.

7.1.25 **Natriumhydroxid,** Molekulargewicht 40,00 g/mol, CAS-Nr.: 1310-73-2.

7.1.26 **Triton X-100,** CAS-Nr.: 9002-93-1.

7.1.27 **Verdünnte Salzsäure,** 1 M (HCl), Molekulargewicht 36,46 g/mol, CAS-Nr.: 7647-01-0.

7.2 **Wasser,** Qualität 3nach ISO 3696; Wasser mit einer Leitfähigkeit von bis zu 5 µS/cm ist geeignet.

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Wenn nötig, Wasser durch Autoklavieren oder durch Filtration sterilisieren (Celluloseacetat, 0,2 µm). Wasser mit dieser Spezifikation auch für die schrittweise Verdünnung der Testprobe verwenden.

7.3 Zelllinie.

Eine genetisch veränderte humane Zelllinie, die den menschlichen Estrogenrezeptor (hERα und/oder hERβ) exprimiert und ein Reporterplasmid für Luciferase enthält. Genauere Beschreibungen der einzelnen Zelllinien sind in Anhang C enthalten.

7.4 Medien.

Immer sterile Lösungen, Glasgeräte usw. verwenden. Alle Verfahren unter aseptischen Bedingungen und in der sterilen Umgebung eines Werkbankes (Standard: „Biologische Gefährdung") durchführen. Falls Autoklavieren notwendig ist, immer für 20 min bei (121 ± 2) °C autoklavieren. Die Gefäße lose abdecken, aber niemals luftdicht verschließen.

7.4.1 Zellkulturmedium.

5,4 ml nicht-essenzielle Aminosäuren (7.1.8), 42 ml FCS (7.1.6) und 1 ml Penicillin-Streptomycin (7.1.9) in eine Flasche mit 500 ml DMEM/F12-Medium mit Phenolrot geben. Das fertige Zellkulturmedium sollte bei 4 °C und höchstens 8 Wochen aufbewahrt werden.

7.4.2 Gefriermedium.

1 ml nicht-essenzielle Aminosäuren, 10 ml DMSO, 20 ml FCS und 1 ml Penicillin-Streptomycin (7.1.9) zu 68 ml DMEM/F12-Medium mit Phenolrot geben. Chargen von 20 ml in steriler Weise auf sterile Röhrchen verteilen. Das fertige Gefriermedium sollte bis zur Verwendung bei (−20 ± 1) °C aufbewahrt und bei der Verwendung mit Eis gekühlt werden.

7.4.3 Konzentriertes Testmedium.

7.4.3.1 3-fach konzentriertes Testmedium.

Den Inhalt eines Fläschchens Zellkulturmedium-Pulver (7.1.22) in 250 ml Wasser (bei Umgebungstemperatur) lösen und anschließend 3,7 g Natriumhydrogencarbonat (7.1.21) in derselben Lösung lösen. Den pH-Wert mit 1 mol/l HCl oder 1 mol/l NaOH-Lösung auf 7,4 einstellen. Mit Wasser auf ein Endvolumen von 300 ml auffüllen und anschließend mittels Filtersterilisieren. 12 ml nicht-essenzielle Aminosäuren (7.1.8), 55 ml gestripptes Serum (7.4.8) und 37 ml Penicillin-Streptomycin (7.1.9) zugeben. Fertige Medien sollten bei (4 ± 1) °C und höchstens 8 Wochen aufbewahrt werden.

7.4.3.2 1-fach konzentriertes Testmedium.

100 ml des 3-fach konzentrierten Testmediums mit 200 ml Wasser verdünnen und mittels Filter sterilisieren. Fertige Medien sollten bei (4 ± 1) °C und höchstens 8 Wochen aufbewahrt werden.

7.4.4 Trypsin-Lösung.

20 ml Trypsin (7.1.5) zu 980 ml PBS (7.1.10) geben und mit 0,2 g EDTA (7.1.4) versetzen. Die Trypsin-Lösung steril filtrieren und in Teilmengen von 50 ml aufteilen. Die Haltbarkeit beträgt 3 Monate ab Herstellungsdatum. Die Röhrchen mit Trypsin bei −20 °C aufbewahren.

7.4.5 Stopp-Reagens.

8,0 g Natriumhydroxid in einem Liter demineralisiertem Wasser lösen, um eine Endkonzentration von 0,2 M zu erhalten.

7.4.6 Substratgemisch.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Tricin (7.1.23) und Magnesiumsulfat (7.1.20) in 500 ml demineralisiertem Wasser vollständig lösen, bis die Lösung klar und farblos ist. Die übrigen Chemikalien aus Tabelle 1 und 400 ml Wasser zugeben. Den pH-Wert mit einer Lösung von 1 mol/l HCl und/oder NaOH auf 7,8 einstellen. Auf ein Endvolumen von 1 l auffüllen. Bei (−20 ± 1) °C für höchstens 3 Monate oder bei (−80 ± 1) °C für höchstens 12 Monate aufbewahren.

Tabelle 1 — Herstellung des Substratgemisches (1 000 ml)

Verbindung	Masse g	Molekulargewicht g/mol	Molarität Mmol/l
Tricin	3,58	179,2	20
$C_4H_2Mg_5O_{14}$	0,52	485,69	1,1
$MgSO_4$	0,31	120,37	2,6
EDTA	0,037	372,23	0,10
DTT	5,14	154,2	33,3
Coenzym A	0,21	767,6	0,27
Luciferin	0,15	320,32	0,47
ATP	0,29	551,1	0,53

7.4.7 Zelllyse-Gemisch.

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Verbindungen in 500 ml demineralisiertem Wasser vollständig lösen. Den pH-Wert mit 1 mol/l HCl- und/oder 1 mol/l NaOH-Lösungen auf 7,8 einstellen. Auf ein Endvolumen von 1 l auffüllen und in Teilmengen von 40 ml aufteilen. Bei ≤ −18 °C (ändern, falls Probleme bei dieser Temperatur auftreten) für höchstens ein Jahr oder bei 4 °C für höchstens 1 Monat aufbewahren.

Tabelle 2 — Zusammensetzung des Zelllyse-Gemisches (1 000 ml)

Verbindung	Masse g	Volumen ml	Molekulargewicht	Konzentration
Tris	3,0		121,1	25 mmol/l
DTT	0,31		154,2	2,0 mmol/l
CDTA	0,73		364,35	2,0 mmol/l
Glycerol		100		10 %
Triton X-100		10		1 %

7.4.8 Gestriptes fetales Kälberserum.

0,6 g Tris (7.1.14) in einem 500-ml-Becherglas in 50 ml demineralisiertem Wasser lösen und den pH auf 8,0 einstellen. 450 ml demineralisiertesdemineralisiertes Wasser, 0,25 g Dextran T500 (7.1.15) und (2),5 g Aktivkohle (7.1.16) hinzugeben. Die Flasche verschließen und über Nacht bei 4 °C rühren. Außerdem eine Flasche FKS (7.1.6) über Nacht bei 4 °C auftauen.

Am nächsten Tag 200 ml des aufgetauten FKS in eine sterile Glasflasche überführen und im Wasserbad für 30 min auf 56 °C erwärmen. Die Aktivkohle-Suspension in 12 saubere 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführen und die Röhrchen für 20 min bei 1 000 *g* zentrifugieren. Die überstehende Flüssigkeit dekantieren. Das FKS auf sechs Röhrchen mit Aktivkohle-Pellets verteilen und erneut suspendieren. Diese Suspension unter Schütteln für 45 min bei 45 °C inkubieren. Die Röhrchen für 20 min bei 1 000 *g* zentrifugieren und das Serum in 6 andere Röhrchen mit frischen Aktivkohle-Pellets dekantieren. Diese Suspension unter Schütteln für weitere 45 min bei

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

45 °C inkubieren. Die Röhrchen für 20 min bei 1 000 *g* zentrifugieren und das Serum in sechs saubere Röhrchen dekantieren. Erneut für 20 min bei 1 000 *g* zentrifugieren, um Aktivkohle-Rückstände zu entfernen. Das Serum vereinigen, mittels Filtersterilisieren und in Teilmengen von 55 ml aufteilen. Bei −20 °C für höchstens sechs Monate aufbewahren.

7.4.9 Stammlösung von 17*β*-Estradiol (E2).

13,6 mg 17*β*-Estradiol (E2) (7.1.3) in 10 ml DMSO (7.1.1) lösen. Diese Stammlösung 1 000-fach Verdünnen, z. B. durch Pipettieren von 1 ml zu 9 ml DMSO und nachfolgend von 1 ml zu 99 ml DMSO (Endkonzentration der Stammlösung: 5,0E-6 M). 1-ml-Aliquote bei ≤ −18 °C aufbewahren.

8 Probenahme und Proben

8.1 Allgemeines

Dieser Abschnitt beschreibt spezifische Anforderungen an die Probenahme hinsichtlich der Bestimmung estrogener Aktivität in Wasserproben. Allgemeine Informationen zur Probenahme sind in ISO 5667-16 enthalten.

8.2 Flaschen und Materialien für die Probenahme

Saubere Glasflaschen (Borosilikatglas) vorzugsweise mit Polypropylen-Verschlusskappen oder Polytetrafluorethylen (PTFE)-beschichteten Verschlusskappen verwenden. Um den photochemischen Abbau von Verbindungen zu vermieden, Braunglasflaschen verwenden. Falls transparente Glasflaschen verwendet werden, diese in Aluminiumfolie einwickeln oder in einem dunklen Behälter lagern.

Alternativ können Flaschen aus Aluminium oder Edelstahl (beide unbeschichtet) verwendet werden. Es ist sicherzustellen, dass andere Materialien als Borosilikatglas die Ergebnisse nicht beeinflusst.

8.3 Vorbereitung von Flaschen und Geräten für die Probenahme

Nach der üblichen Reinigung die Flaschen und die Verschlusskappen zusätzlich wie folgt reinigen: saubere Flaschen und die Verschlusskappen dreimal mit einer geringen Menge Aceton (7.1.24) spülen. Das anhaftende Aceton verdampfen lassen (z. B. Trockenschrank). Die Flaschen sofort nach dem Trocknen schließen. Alle Glasgeräte, Spatel usw., die in Kontakt mit der Probe kommen, dreimal mit einer geringen Menge Aceton (7.1.24) spülen. Das anhaftende Aceton verdampfen lassen.

8.4 Probenahmeverfahren

Während der Probenahme Einweg-Nitrilhandschuhe tragen. Vor der Probenahme keine Handcreme benutzen und Hautkontakt mit der Probe vermeiden. Nur Material aus Glas, PTFE, Aluminium oder Edelstahl verwenden.

Die Flaschen vollständig füllen. Eine mögliche Ausdehnung der Probe aufgrund einer Temperaturänderung berücksichtigen. Wenn die Proben im Rahmen ihrer Konservierung eingefroren werden sollen, dürfen die Flaschen nicht vollständig gefüllt werden. Dies dient dazu, einen Bruch der Flasche zu verhindern, der durch die Volumenzunahme beim Einfrier- und Auftauprozesses entstehen könnte.

Die Proben nicht mit Chemikalien stabilisieren.

Die Proben entweder auf 2 °C bis 8 °C kühlen oder bei ≤ −18 °C einfrieren.

8.5 Probentransport

Die Proben so schnell wie möglich nach der Probenahme an das Labor liefern.

Den Probenbehälter frost- und bruchfest transportieren und vor Lichteinwirkung, Temperaturanstieg und äußerer Verschmutzung schützen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Für längere Transportwege der Probe diese kühlen, oder — bei längeren Zeiten — einfrieren. Die Kühlung so bald wie möglich nach der Probenahme beginnen, z. B. in Kühlboxen mit Eis, gefrorenen Gelpackungen oder Kühlelementen. Eine Kühlvorrichtung im Transportfahrzeug ist ebenfalls geeignet. Eine Kühltemperatur während des Transports von 2 °C bis 8 °C hat sich als geeignet erwiesen. Die vorgeschlagene Kühltemperatur gilt für die Umgebung der Probe (z. B. in der Kühlbox) und nicht für die Probe selbst.

Wenn die Probe gefroren ist, das Auftauen der Probe vermeiden (z. B. durch Transport auf Trockeneis). Wenn Trockeneis für den Transport ausgewählt wird, die Flaschen in Papier oder Luftpolsterfolie einwickeln, um direkten Kontakt mit dem Trockeneis zu vermeiden.

8.6 Vorbehandlung der Probe

Um den möglichen Verlust partikelbedingter estrogener Aktivität zu vermeiden, unfiltrierte Proben möglichst unmittelbar nach der Probenahme analysieren. Die Entscheidung über eine Probenfiltration (z. B. Celluloseacetat, 0,45 µm Porengröße) muss vom ausführenden Labor in Abhängigkeit der Fragestellung und der Erfahrungen mit dem zu untersuchenden Probentyp gefällt werden. In jedem Fall protokollieren, ob eine gefilterte oder unfiltrierte Probe getestet wurde. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Filtration auf Proben mit estrogener Aktivität finden sich in den Referenzen [20] und [21].

Die Probe mit HCl (7.1.27) oder NaOH-Lösung (7.1.25) auf einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2 einstellen. Die Säure- oder Alkalikonzentration so wählen, dass die zugegebenen Volumina so gering wie möglich sind. Übertitrationen vermeiden. Die Einstellung des pH-Werts der Probe kann Auswirkungen auf die Probe haben. Alle sichtbaren Veränderungen, die durch die Einstellung des pH-Werts verursacht werden (ISO 5667-16), protokollieren.

8.7 Lagerung der Proben

Die Proben sofort nach der Probenahme testen. Wenn dies nicht möglich ist, die Wasserproben bei 2 °C bis 8 °C (< 7 d) oder bei Temperaturen unter −18 °C (bis zu zwei Monaten) aufbewahren. Für mehrere Tests größere Probenvolumina im Voraus in geeignete Portionen aufteilen, da aufgetaute Proben nur am selben Tag angesetzt werden können. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Proben vor der Analyse vermeiden. Die Probe im Dunkeln bei einer maximalen Temperatur von 25 °C (z. B. Wasserbad) oder zwischen 2 °C und 8 °C über Nacht auftauen. Zum Auftauen von Proben keine Mikrowelle verwenden.

Die Lagerung der Probe kann sich auf die estrogene Aktivität der Probe auswirken. Mögliche Änderungen sind probeabhängig. Dauer und Bedingungen für die Probenlagerung auf der Grundlage von Erfahrungen mit dem jeweiligen Probentyp festlegen. Weitere Informationen über mögliche Auswirkungen der Lagerung auf Proben mit estrogener Aktivität finden sich in den Referenzen [22] und [23].

9 Testverfahren

9.1 Erhaltung der Zellkultur

Alle Verfahrensschritte werden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

9.1.1 Einfrieren der Zellen

Zellen trypsinieren, die subkonfluent sind, wie in 9.1.3 angegeben, und in 10 ml Zellkulturmedium (7.4.1) erneut suspendieren. Bevor mit dem Einfrieren fortgefahren wird, das Kryoröhrchen vorbereiten: jedes Kryoröhrchen mit der Zellart, Chargennummer und dem Einfrierdatum kennzeichnen. Die Passagezahl verfolgen. Die Zellen in ein 12-ml-Zellkulturröhrchen überführen. Die Zellen zentrifugieren (250 x *g*, 5 min), das überstehende Medium dekantieren und die Zellen wieder in 4 ml eiskaltem Gefriermedium (7.4.2) suspendieren. Zellen und Gefriermedium nicht mehr als dreimal mischen. 1 ml dieser Zellsuspension in Kryoröhrchen (6.21) auf Eis überführen und die Röhrchen schnell verschließen. Die Kryoröhrchen in eine Polystyrenbox stellen, die Kryoröhrchen mit Zellstoff bedecken, um ein allmähliches Einfrieren der Zellen zu erleichtern und über Nacht bei −80 °C aufbewahren. Am nächsten Tag die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstoffbehälter zur längeren Aufbewahrung überführen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

9.1.2 Ansetzen einer neuen Zellkultur

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen schnell bei 37 °C auftauen. Die Zellsuspension in ein 15-ml-Röhrchen überführen und tropfenweise mit 10 ml kaltem Zellkulturmedium versetzen. Die Zellsuspension zentrifugieren (250 x *g*, 5 min) und die überstehende Flüssigkeit dekantieren. Die Zellen wieder in 10 ml Kulturmedium (bei Umgebungstemperatur) suspendieren, in eine neue Zellkulturflasche (6.11) überführen und in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2, 37 °C, 100 % Feuchte) inkubieren, bis sie subkonfluent sind.

9.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Zellen in einer Zellkulturflasche aus dem Inkubator nehmen. Das Zellkulturmedium entfernen und die Zellen zweimal mit etwa 5 ml PBS (7.1.10) waschen. 2 ml Trypsin zu den Zellen geben, schwenken und das Trypsin entfernen. Die Zellen zum Trypsinieren im Inkubator lassen, bis sich die Zellen von der Oberfläche gelöst haben (etwa 2 min). Die Zellen wieder in 10 ml Kulturmedium suspendieren, einen kleinen Teil in eine neue Zellkulturflasche überführen (siehe das in Anhang C definierte Subkulturverhältnis) und, falls notwendig, die Zellen mit einem Zellzähler (6.19) zählen. Zellkulturmedium zugeben bis zu einem Endvolumen von 10 ml und die Zellkulturflasche in den CO_2-Inkubator legen.

9.2 Reportergen-Testverfahren mit humanen Zellen

WICHTIG — Nach dem Auftauen der Zellen aus einer Stammkultur, die Zellen vor der Verwendung im Test zwei- bis dreimal passagieren

Das Verfahren dauert zwei Tage: Impfen der Zellen am Tag 1 und Exposition am Tag 2. Nach der Exposition werden die Zellen für 24 h inkubiert. Eine Platte kann 10 Verdünnungen einer Probe aufnehmen. Jede Platte schließt eine Dosis-Wirkungskurve einer Referenzverbindung ein. Alle Verfahrensschritte werden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

9.2.1 Impfen der Zellen (Tag 1)

Subkonfluente Zellen (85 % bis 95 % Konfluenz) aus der Zellkulturflasche durch enzymatischen Aufschluss (Trypsin/EDTA) (9.1.3) entfernen und wieder in 1-fach konzentriertem Testmedium (7.4.3) suspendieren. Die Zellsuspension in ein steriles 50-ml-Röhrchen überführen und die Zellkonzentration mit einem Zellzähler (6.19) bestimmen. Die Zellsuspension je nach Art der verwendeten Zelllinie mit 1-fach konzentriertem Testmedium auf eine Konzentration von 5 000 bis 20 000 Zellen je Vertiefungen einer Platte verdünnen. Diese Zellsuspension zum Füllen der inneren 60 Vertiefungen der 96- Well-Plattenverwenden (siehe Bild 1; 100 µl Zellsuspension je Vertiefung). Die äußeren 36 Vertiefungen der Platten mit jeweils 200 µl PBS füllen. Die Mikrotiterplatten in den CO_2-Inkubator überführen und für 16 h bis 24 h (über Nacht) inkubieren. Am nächsten Tag jede Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop untersuchen, um sicherzustellen, dass die Zellen subkonfluent sind, das Zellwachstum relativ gleichmäßig ist und keine Kontaminationen vorliegen.

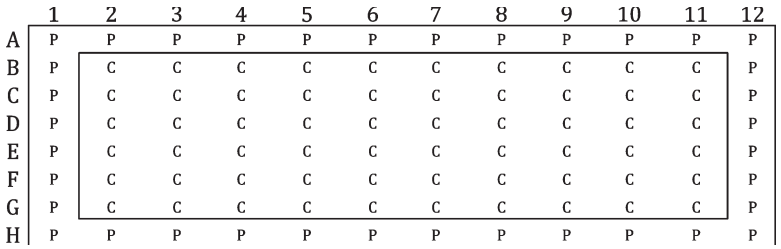


Bild 1 — Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte nach der Subkultivierung

ANMERKUNG P wird mit 200 µl PBS und C mit 100 µl Zellsuspension gefüllt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

9.2.2 Herstellung der E2-Referenz (Tag 2)

Ein Aliquot der 17β-Estradiol(E2)-Stammlösung (7.4.9) auftauen (5,0E-06 mol/l). Die aufgetaute Stammlösung 1 → 100 in Wasser verdünnen (z. B. 100 µl E2-Lösung + 9 900 µl Wasser, wodurch eine Stammlösung von 5,0E-8 mol/l E2 erhalten wird). Die 1 → 100 verdünnte Stammlösung nochmals mit Wasser 1 → 100 verdünnen (E2-Endkonzentration von 5,0E-10 mol/l; DMSO-Konzentration beträgt 0,01 %, die die Testergebnisse nicht beeinflusst). Aus dieser 5,0E-10-M-Stammlösung eine Verdünnungsreihe nach dem Plan in Tabelle 3 herstellen. Alle Verdünnungen sollten in Glasröhrchen mit Polytetrafluorethylen(PTFE)-Verschlusskappen hergestellt werden. 150 µl der Verdünnungen in den Röhrchen (7) und (8) verwerfen, damit das Endvolumen in sämtlichen Röhrchen 1 350 µl beträgt. 675 µl des 3-fach konzentrierten Testmediums (7.4.3) in jedes der Röhrchen geben und durchmischen. Das Volumen der hergestellten E2-Referenz reicht für drei 96 Well-Platten.

Tabelle 3 — Verdünnungsstufen für die Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2)

Röhrchen	Wasser	Zugabe	[E2] mol/l	[E2] mol/l	[E2] ng/l
			in Wasser	in Medium	in Medium
(1)	0 µl	1 500 µl der 5,0E-10 mol/l E2-Stammlösung	5,0E-10	3,3E-10	90,8
(2)	1 050 µl	450 µl der 5,0E –10 mol/l E2-Stammlösung	1,5E-10	1,0E-10	27,2
(3)	1 350 µl	150 µl von(1)	5,0E-11	3,3E-11	9,08
(4)	1 350 µl	150 µl von (2)	1,5E-11	1,0E-11	2,72
(5)	1 350 µl	150 µl von (3)	5,0E-12	3,3E-12	0,908
(6)	1 350 µl	150 µl von (4)	1,5E-12	1,0E-12	0,272
(7)	1 350 µl	150 µl von (5) (und 150 µl verwerfen)	5,0E-13	3,3E-13	0,090 8
(8)	1 350 µl	150 µl von (6) (und 150 µl verwerfen)	1,5E-13	1,0E-13	0,027 2
(9)	1 350 µl	—	0,0E+00	0,0E+00	0,0

ANMERKUNG Das Volumen der hergestellten E2-Referenzkonzentration reicht für drei 96 Well-Platten.

9.2.3 Herstellung der Probenverdünnungen (Tag 2)

Die Probe vor dem Gebrauch durch Schütteln homogenisieren. Neun aufeinanderfolgende Verdünnungen der Testprobe mit sterilem Wasser vorbereiten, was zu zehn Verdünnungsstufen führt (siehe Tabelle 4). Es können weniger Verdünnungsstufen verwendet werden, vorausgesetzt, dass das erhaltene Signal für die Berechnung der 17β-Estradiol-Äquivalente für die Testproben genutzt werden kann. Alle Verdünnungen in Glasröhrchen mit Polytetrafluorethylen(PTFE)-Verschlusskappen herstellen. 500 µl der letzten beiden Verdünnungen (Röhrchen (9) und (10)) verwerfen, damit das Endvolumen in sämtlichen Röhrchen 500 µl beträgt. In jedes Röhrchen 250 µl des 3-fach konzentrierten Testmediums (7.4.3) geben. Ein empfohlenes System für Chemikalien und Extrakte ist in Anhang D und Anhang E angegeben.

Tabelle 4 — Verdünnungsstufen für die Wasserproben

Röhrchen	Wasser	Zugabe	Verdünnungsfaktor (*D*)	% Probe
(1)	0 µl	500 µl der Probe	1x	100,0
(2)	500 µl	500 µl der Probe	2x	50,0

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Tabelle 4 (*fortgesetzt*)

Röhrchen	Wasser	Zugabe	Verdünnungsfaktor (*D*)	% Probe
(3)	667 µl	333 µl der Probe	3x	33,3
(4)	500 µl	500 µl von (2)	4x	25,0
(5)	500 µl	500 µl von (3)	6x	16,7
(6)	500 µl	500 µl von (4)	8x	12,5
(7)	500 µl	500 µl von (5)	12x	8,3
(8)	500 µl	500 µl von (6)	16x	6,3
(9)	500 µl	500 µl von (7) (und 500 µl verwerfen)	24x	4,2
(10)	500 µl	500 µl von (8) (und 500 µl verwerfen)	32x	3,1

9.2.4 Feldblindwert

Die Feldblindwertlösung wie die Proben vorbereiten, jedoch ohne Verdünnungen. Für jede Probe muss (am selben Tag) ein repräsentativer Feldblindwert unter Verwendung der gleichen Medien, Zellkultur und Geräte bestimmt werden. Wenn ein Feldblindwert für eine Probenserie repräsentativ ist, muss er nur einmal getestet werden.

9.2.5 Exposition der Zellen (Tag 2)

Jede Vertiefung (Probe, Verdünnungen, Kontrollen, Feldblindwert) mit einem Volumen von 200 µl befüllen. Jede Probe bei zehn Verdünnungen testen, wobei jede Verdünnungsstufe dreimal auf derselben Platte vorliegt. Zusätzlich muss die Probenplatte mindestens drei Replikate der Negativkontrolle enthalten. Bei jeder Platte eine Dosis-Wirkungs-Kurve der Referenzverbindung 17β-Estradiol einbeziehen.

Die Exposition erfolgt in zwei Schritten. Zuerst das Medium durch Ansaugen aus den Vertiefungen der Platten B2 bis D11 (Vertiefungen der Platten für Referenzverbindung und Feldblindwert) entfernen. 200 µl jeder Konzentration der Referenzverbindungen (9.2.2) (dreifache Ausführung) entsprechend der Plattenbelegung in Anhang B hinzugeben. 200 µl der Feldblindprobe (dreifache Ausführung), entsprechend der Plattenbelegung in Anhang B hinzugeben. Zweitens das Medium durch Ansaugen aus den Vertiefungen der Platten E2 bis G11 (Vertiefungen der Platten für Probenverdünnungen) entfernen. 200 µl jeder der Probenverdünnungen (9.2.3) (dreifache Ausführung) entsprechend der Plattenbelegung in Anhang B hinzugeben. Sicherstellen, dass die Zellen nicht länger als 2 min ohne Medium sind. Nach der Exposition die Mikrotiterplatte in den CO_2-Inkubator (100 % Feuchte, 5 % CO_2, 37 °C) überführen und 24 h inkubieren. Eine empfohlene Plattenbelegung ist in Anhang B dargestellt.

9.2.6 Ernten der Zellen (Tag 3)

Nach 24 h Behandlung jede Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop untersuchen, um gegebenenfalls systematische Zellimpffehler und die Wachstumseigenschaften der Kontrollzellen und behandelten Zellen festzustellen. Die Änderungen in der auf zytotoxischen Wirkungen des Testprobenextrakts beruhenden Morphologie der Zellen aufzeichnen, aber diese Aufzeichnungen nicht als quantitatives Maß der estrogenen Aktivität verwenden. Unerwünschte Wachstumseigenschaften der Kontrollzellen können auf einen Versuchsfehler hinweisen und ein Grund für die Rückweisung des Tests sein.

Zum Ernten der Zellen das Medium von den Zellen trennen und in jede der inneren 60 Vertiefungen der Platten (siehe Bild 1) 300 µl des Zellllyse-Reagens geben. Die Platte zum Messen der Lumineszenz (9.2.7) 15 min bei Umgebungstemperatur schütteln oder für bis zu zwei Wochen bei < −20 °C aufbewahren.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

9.2.7 Messung der Lumineszenz (Tag 3)

Das Substratgemisch (7.4.6) auftauen und Umgebungstemperatur annehmen lassen. Wenn gefrorene Platten gemessen werden müssen, diese die Umgebungstemperatur annehmen lassen, bevor mit der Messung fortgefahren wird. Nur die Lumineszenz der inneren 60 Vertiefungen der 96-Well-Platte (Vertiefung für Vertiefung) mit einem Luminometer bei folgenden Einstellungen messen:

— Zugabe von 100 µl Substratgemisch in eine Vertiefung der Platte (7.4.6);

— Messung der Lumineszenz für 4 s;

— Zugabe von 100 µl Stoppreagens (7.4.5);

— Fortsetzung mit der nächsten Vertiefung.

Fortfahren, bis alle Platten gemessen wurden. Alle Messdaten in Dateien exportieren, die später in die Berechnungsprogramme importiert werden können. Eine empfohlene Konfiguration des Luminometers ist in Anhang A angegeben.

9.3 Datenauswertung

9.3.1 Berechnung der Reportergeninduktion

Die Induktionsrate (I(i)) ist ein Maß für die Induktion der estrogenrezeptor-vermittelten Wirkung der Probenverdünnungen und E2-Referenzkonzentrationen in dem Test im Vergleich zur Basisaktivität des Rezeptors, die mit der Referenzlösemittel-Negativkontrolle bestimmt wird. Die Induktionsrate der Probenverdünnungen und E2-Referenzkonzentrationen im Test (i) nach der folgenden Gleichung (1) berechnen

$$\mathrm{I}\,(i) = \frac{\mathrm{RLU}\,(i)}{\mathrm{RLU}\,(\mathrm{NC})} \tag{1}$$

Dabei ist

I(i) die Induktionsrate der Probenverdünnung oder E2-Referenzkonzentration im Test i;

RLU(i) die estrogene Wirkung (relative Lichteinheiten) der Probenverdünnung oder E2-Referenzkonzentration im Test i;

RLU(NC) die mittlere estrogene Wirkung (relative Lichteinheiten) der Referenzlösemittel-Negativkontrolle (0 mol/l E2-Konzentration) im Test i.

Den Mittelwert I(i) für alle Tests und die jeweilige Standardabweichung (sigma (i)) berechnen. Für die Bewertung der Testergebnisse diese Mittelwerte verwenden. Die mittlere Induktionsrate für die nachfolgende statistische Auswertung und die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve verwenden. Die mittlere Induktionsrate auch für die Berechnung der 17β-Estradiol-Äquivalente verwenden, wie in Anhang H beschrieben.

9.3.2 Berechnung des Prozentsatzes der maximalen Wirkung

Der Prozentsatz der maximalen Wirkung (% Max) gibt die Wirkung der estrogen-vermittelten Wirkung in den Proben im Vergleich zur maximalen Wirkung der Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2) quantitativ wieder. Dies hat den Vorteil, dass Ergebnisse zwischen Labor und Tests unabhängig von den datums- und ortsspezifischen Schwankungen der relativen Lichteinheiten oder Induktionsfaktoren der einzelnen Tests verglichen werden können. Die maximale Wirkung wird 100 % und der Hintergrund 0 % gesetzt. % Max eines Tests (i) wird nach der folgenden Gleichung (2) berechnet:

$$\%\ \mathrm{Max}\,(i) = \frac{I_{\mathrm{Sample}} - 1}{I_{\mathrm{E2}} - 1} \times 100 \tag{2}$$

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Dabei ist

% Max(i) die relative Wirkung einer Probe im Vergleich zur maximalen Wirkung von E2 im Test i;

I_{Sample} die Induktionsrate der Probe im Test i;

I_{E2} der mittlere Induktionswert der E2-Konzentration 1E-10 mol/l des Tests i.

9.3.3 Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve

Jede 96-Well-Platte schließt eine Dosis-Wirkungs-Kurve der Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2) ein.

Kalibrierdosis-Wirkungs-Kurve: Berechnung einer Kalibrierkurve mit Hilfe des Prozentsatzes der maximalen Induktion aus den verschiedenen 17β-E2-Konzentrationen auf Grundlage der in Anhang H angegebenen Gleichung.

Probenverdünnungs-Wirkungs-Kurve: Berechnung der Verdünnungs-Wirkungs-Kurve mit Hilfe des Prozentsatzes der maximalen Induktion aus den verschiedenen Probenverdünnungen auf Grundlage der in Anhang H angegebenen Gleichung (H.1).

10 Gültigkeitskriterien

10.1 Gültigkeitskriterien für den Test

Der Test ist gültig, wenn:

a) der EC50-Konzentrationsbereich von 17β-Estradiol im Bereich von 1,6 pmol/l bis 34 pmol/l liegt;

b) die minimale Induktion der höchsten 17β-Estradiol-Konzentration in Bezug auf die Referenzlösemittelkontrolle gleich oder größer als 5 ist;

c) die Korrelation R2 of the 17β-Estradiol-Dosis-Wirkungs-Kurve gleich oder größer 0,98 ist.

Bei Nichterfüllung eines dieser Kriterien ist die gesamte Test-Mikrotiterplatte ungültig.

10.2 Gültigkeitskriterien für die Proben

Bei Gültigkeit der Kriterien für die Test-Mikrotiterplatte sind die Ergebnisse der einzelnen Verdünnungen einer Probe gültig, wenn:

a) die relative Standardabweichung zwischen den ausgewählten drei Replikaten < 15% (Abweichung zwischen den Vertiefungen der Platten) beträgt. Falls die untersuchte Probenkonzentration in allen drei Replikatvertiefungen der Platten keine Wirkung oberhalb der LOD zeigt, darf die relative Standardabweichung > 15 %, muss aber < 30 % sein;

b) keine anderen Störbedingungen beobachtet wurden, z. B. Kontamination, Zytotoxizität usw.

Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, muss die Probe nochmals getestet werden. Wenn die höchste Verdünnung der Proben weiterhin eine Wirkung oberhalb der LOQ zeigt, müssen höhere Verdünnungen getestet werden, um den Verdünnungsfaktor G zu bestimmen. In diesem Fall werden die Proben mit den beiden höchsten Verdünnungsfaktoren wieder in die Wiederholungsanalyse einbezogen. Höhere Verdünnungsfaktoren können nach dem in Anhang E angegebenen Plan hergestellt werden. Validierungsdaten eines Ringversuch, welche auf die hier beschriebene Methode beruht, wird in Anhang F beschriebenen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

11 Bewertungskriterien

Der Testprobe wird eine estrogene Aktivität bescheinigt, wenn ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg der Reportergenaktivierung im Vergleich zum Feldblindwert gemessen wird. Ein Beispiel für eine statistische Bewertung findet sich in Anhang H.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

a) Angabe des verwendeten Untersuchungsverfahrens mit einer Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 19040-3:2018);

b) Identität der Testprobe (Herkunft und Datum der Probenahme, pH-Wert, Leitfähigkeit);

c) Referenzverbindung (chemische Bezeichnung, Quelle, Chargennummer oder vergleichbare Daten, falls verfügbar);

d) Aufbewahrung der Probe und Herstellung der Testprobe [Aufbewahrungsbedingungen und -dauer (falls nicht direkt getestet) und weitere Handhabungen];

e) verwendete Zelllinie, einschließlich Passagezahl/Zellportion;

f) Testumgebung (Anschrift des Testlabors, Datum des Tests, Luminometer-Messgerät);

g) Testergebnisse (mittlere Induktionsraten für Feldblindwert sowie für jede getestete Probenkonzentration und Referenzverdünnung mit prozentualer Standardabweichung, qualitative Bewertung der Estrogenität der Probe (ja/nein) mit Angaben zur statistischen Auswertung), Angabe toxischer Wirkungen (falls vorhanden) und andere Beobachtungen (z. B. Niederschlag, Kontamination der Probe). Wenn EEQ-Werte für die Probe oder Probenverdünnungen berechnet werden, ist eine weitere Berichterstattung nach Anhang H erforderlich. Wenn G-Werte berechnet werden, ist eine weitere Berichterstattung nach Anhang I erforderlich.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Anhang A
(informativ)

Konfiguration des Luminometers

Um die Lumineszenz in den transparenten 96-Well-Platten zu messen, benötigt der Luminometer zwei verfügbare Injektoren: einen für die Zugabe des Substrats und einen zweiten für die Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung zum Unterdrücken des Lumineszenzsignals. Folgende Einstellungen werden verwendet:

— Volumen des Injektors I: 100 µl Luciferase Substrat-Lösung (zur Lichterzeugung);

— Volumen des Injektors II: 100 µl 0,2 mol/l NaOH-Lösung (zum Unterdrücken des Signals);

— Messdauer nach Zugabe von 100 µl Luciferase-Ansatz: 4 s.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Anhang B
(informativ)

Testplattenbelegung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		E2 -0	E2 1,0 E-13	E2 3,3 E-13	E2 1,0 E-12	E2 3,3 E-12	E2 1,0 E-11	E2 3,3 E-11	E2 1,0 E-10	E2 3,3 E-10	1	
C		E2 -0	E2 1,0 - E-13	E2 3,3 E-13	E2 1,0 E-12	E2 3,3 E-12	E2 1,0 E-11	E2 3,3 E-11	E2 1,0 E-10	E2 3,3 E-10	1	
D		E2 -0	E2 1,0 E-13	E2 3,3 E-13	E2 1,0 E-12	E2 3,3 E-12	E2 1,0 E-11	E2 3,3 E-11	E2 1,0 E-10	E2 3,3 E-10	1	
E		32&[a]	24&[a]	16&[a]	12&[a]	8&[a]	6&[a]	4&[a]	3&[a]	2&[a]	1&[a]	
F		32&[a]	24&[a]	16&[a]	12&[a]	8&[a]	6&[a]	4&[a]	3&[a]	2&[a]	1&[a]	
G		32&[a]	24&[a]	16&[a]	12&[a]	8&[a]	6&[a]	4&[a]	3&[a]	2&[a]	1&[a]	
H												

Legende

1 Feldblindwert
[a] Probe.

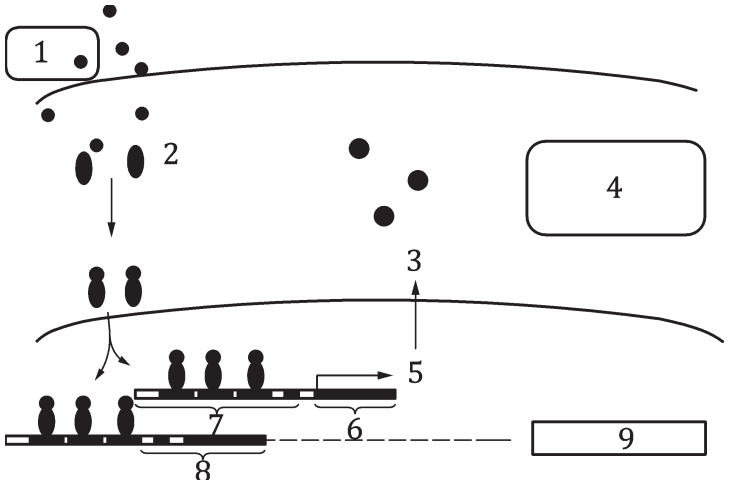
Bild B.1 — Testplattenbelegung für eine Probe mit 10 sukzessiven Verdünnungsstufen (in dreifacher Ausführung)

Bei jeder Platte eine Dosis-Wirkungs-Kurve der Referenzverbindung 17β-Estradiol (E2) einbeziehen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Anhang C
(informativ)

Eigenschaften und Einzelheiten des Biotests



Legende

1 Chemikalie (Gemisch)
2 Rezeptor
3 Luciferase Protein
4 Lichtsignal proportional zur Menge der biologischen aktiven Chemikalie in der Probe
5 Luciferase-mRNA
6 Luciferase
7 rezeptor-bindende Elemente
8 endogenes Gen
9 biologische Wirkung

Bild C.1 — Testprinzip

Estrogene Verbindungen, die in einem komplexen Gemisch vorliegen, diffundieren in die Zelle, wo sie sich an den humanen Estrogenrezeptor (hER) binden können. Auf Grund der Rezeptorbindung dimerisieren die aktivierten Estrogenrezeptoren und werden aktiv in den Zellkern transportiert. Das Rezeptordimer bindet und aktiviert einen Promotor, der auf Estrogen ansprechende Elemente enthält. Dadurch produziert die Zelle das Enzym Luciferase, das durch Zugabe des Substrats Luciferin und Messen der Lichterzeugung quantitativ bestimmt werden kann. Die Expression des Reportergens, bewertet durch die Menge des erzeugten Lichts, ist proportional zur Aktivierung des humanen Estrogenrezeptors durch das (Xeno-)Estrogen (siehe Bild C.1).

ERalpha CALUX

Der ERalpha CALUX exprimiert den humanen Estrogenrezeptor alpha (hERα) in humanen osteoplastischen Osteosarkom-U2-OS-Zellen. Die Zelllinie enthält ein Plasmid mit Wiederholungen der auf Estrogen ansprechenden Elemente (ERE), das die Expression der Reportergen-Luciferase kontrolliert (siehe Literaturhinweise [10] bis [18]). Der Test ist für Estrogene hochselektiv, da multimerisierte, auf Hormone reagierende Elemente in Reporterkonstrukten vor einer TATA-Box nur kloniert werden, um Störungen durch andere Promoterelemente zu verhindern (Literaturhinweise [17] und [18]). Bezüglich der Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis siehe Tabelle C.1.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09

Tabelle C.1 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis

Zeit bis zur nächsten Subkultur	75-cm^2-Flasche
3 d	1 : 4
4 d	1 : 8

MELN

Die MELN-Zelllinie stammt von der human Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 ab, die mit einem Plasmid stabil transfiziert wurde, welches das Luciferasegen enthält, gesteuert durch ein ERE vor einem β-Globin-Promoter (Literaturhinweis [19]). Die Zellen exprimieren sowohl ERα als auch ERβ endogen. Eine geringfügige Anpassung ist für diese Zelllinie erforderlich: am Tag 2 wird das Medium aufgefrischt und am Tag 3 werden die Zellen exponiert (Tag 2 im Testprotokoll). Bezüglich der Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis siehe Tabelle C.2.

Tabelle C.2 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis

Zeit bis zur nächsten Subkultur	75-cm^2-Flasche
3 d	1 : 3
4 d	1 : 5

ER CALUX

Die ER CALUX-Zelllinie stammt von der human Brustkrebs-Zelllinie T47D ab, die mit einem Plasmid stabil transfiziert wurde, welches das Luciferase-Gen enthält (siehe (Literaturhinweise [12],[14],[15]). Bezüglich der Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis siehe Tabelle C.3.

Tabelle C.3 — Vorgaben für das Subkultur-Verhältnis

Zeit bis zur nächsten Subkultur	75-cm^2-Flasche
3 d	1 : 3
4 d	1 : 5

Dieses Dokument beruht auf der Bewertung und dem Ringversuch mit den vorstehend angeführten In-vitro-Reportergentests mit humanen Zellen. Andere Reporter-Zelllinien, z. B.: HELN-ERalpha, HELN-ERbeta, HeLa-9903 oder T47D-kbLuc, können verwendet werden, wenn sie die beschriebenen allgemeinen Anforderungen nach Abschnitt 10 erfüllen. Außerdem muss die Laborleistungsfähigkeit durch kontinuierliche Teilnahme an Ringversuchen zur Bestimmung des estrogenen Potentials von Wasser und Abwasser nachgewiesen werden.

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 19040-3:2022-09