E DIN EN ISO 19040-3:2022-09 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2022-07-29

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

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 Reporter-gen-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 Reporter-gen-induktion	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

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 Zellyse-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 <i>In-vitro</i> -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