

**Art. 5.** Le présent arrêté entre en vigueur le 1<sup>er</sup> janvier 1999.

**Art. 6.** Notre Ministre de l'Emploi et du Travail, Notre Ministre des Affaires sociales et Notre Ministre de la Santé publique sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 11 janvier 1999.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET  
La Ministre des Affaires sociales,  
Mme M. DE GALAN  
Le Ministre de la Santé Publique,  
M. COLLA

—————  
Note

(1) Références au *Moniteur belge* :

Loi du 29 juin 1981, *Moniteur belge* du 2 juillet 1981.

Loi du 26 juillet 1996, *Moniteur belge* du 1<sup>er</sup> août 1996.

Loi du 6 décembre 1996, *Moniteur belge* du 24 décembre 1996.

Loi du 13 février 1998, *Moniteur belge* du 19 février 1998.

Arrêté royal du 5 février 1997, *Moniteur belge* du 27 février 1997.

Arrêté royal du 5 mai 1997, *Moniteur belge* du 23 mai 1997.

Arrêté royal du 6 juillet 1997, *Moniteur belge* du 12 juillet 1997.

Arrêté royal du 16 avril 1998, *Moniteur belge* du 24 avril 1998.

Arrêté royal du 10 août 1998, *Moniteur belge* du 27 août 1998.

**Art. 5.** Dit besluit treedt in werking op 1 januari 1999.

**Art. 6.** Onze Minister van Tewerkstelling en Arbeid, Onze Minister van Sociale Zaken en Onze Minister van Volksgezondheid zijn, ieder wat hem betreft, belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 11 januari 1999.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMET  
De Minister van Sociale Zaken,  
Mevr. M. DE GALAN  
De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

—————  
Nota

(1) Verwijzingen naar het *Belgisch Staatsblad* :

Wet van 29 juni 1981, *Belgisch Staatsblad* van 2 juli 1981.

Wet van 26 juli 1996, *Belgisch Staatsblad* van 1 augustus 1996.

Wet van 6 december 1996, *Belgisch Staatsblad* van 24 december 1996.

Wet van 13 februari 1998, *Belgisch Staatsblad* van 19 februari 1998.

Koninklijk besluit van 5 februari 1997, *Belgisch Staatsblad* van 27 februari 1997.

Koninklijk besluit van 5 mei 1997, *Belgisch Staatsblad* van 23 mei 1997.

Koninklijk besluit van 6 juli 1997, *Belgisch Staatsblad* van 12 juli 1997.

Koninklijk besluit van 16 april 1998, *Belgisch Staatsblad* van 24 april 1998.

Koninklijk besluit van 10 augustus 1998, *Belgisch Staatsblad* van 27 augustus 1998.

MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES,  
DE LA SANTÉ PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT

F. 99 — 113

[C - 98/22834]

**14 DECEMBRE 1998.** — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement

ALBERT II, Roi des Belges,

A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 24 février 1921 concernant le trafic des substances vénéneuses, soporifiques, stupéfiants, désinfectantes et antiseptiques, notamment l'article 1<sup>er</sup>, modifié par les lois des 11 mars 1958, 1<sup>er</sup> juillet 1976 et 14 juillet 1994;

Vu la loi du 4 août 1996 relative au bien-être des travailleurs lors de l'exécution de leur travail;

Vu la loi du 28 mai 1956 relative aux substances et mélanges explosibles ou susceptibles de déflagrer et aux engins qui en sont chargés;

Vu la loi du 11 juillet 1969 relative aux pesticides et aux matières premières pour l'agriculture, l'horticulture, la sylviculture et l'élevage;

Vu la loi du 24 janvier 1977 relative à la protection de la santé des consommateurs en ce qui concerne les denrées alimentaires et les autres produits, modifiée par la loi du 22 mars 1989;

Vu la loi du 14 juillet 1991 sur les pratiques du commerce, et sur l'information et la protection du consommateur, modifiée par la loi du 5 novembre 1993;

Vu la directive 67/548/CEE du Conseil des Communautés européennes du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, modifiée en dernier lieu par la directive 96/56/CE du Parlement européen et du Conseil du 3 septembre 1996;

Vu la directive 94/69/CE de la Commission du 19 décembre 1994 portant vingt et unième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses;

MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN,  
VOLKSGEZONDHEID EN LEEFMILIEU

N. 99 — 113

[C - 98/22834]

**14 DECEMBER 1998.** — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

ALBERT II, Koning der Belgen,

Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 24 februari 1921 betreffende het verhandelen van giftstoffen, slaapmiddelen en verdovende middelen, ontsmettingsstoffen en antiseptica, inzonderheid op artikel 1, gewijzigd bij de wetten van 11 maart 1958, 1 juli 1976 en 14 juli 1994;

Gelet op de wet van 4 augustus 1996 betreffende het welzijn van de werknemers bij de uitvoering van hun werk;

Gelet op de wet van 28 mei 1956 betreffende ontplofbare en voor deflagratie vatbare stoffen en mengsels en de daarmee geladen tuigen;

Gelet op de wet van 11 juli 1969 betreffende de bestrijdingsmiddelen en de grondstoffen voor de landbouw, tuinbouw, bosbouw en veeteelt;

Gelet op de wet van 24 januari 1977 betreffende de bescherming van de gezondheid van de verbruikers op het stuk van de voedingsmiddelen en andere producten, gewijzigd bij de wet van 22 maart 1989;

Gelet op de wet van 14 juli 1991 betreffende de handelspraktijken en de voorlichting en bescherming van de consument, gewijzigd bij de wet van 5 november 1993;

Gelet op de richtlijn 67/548/EEG van de Raad van de Europese Gemeenschappen van 27 juni 1967 betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de Lid-Staten inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen, laatstelijk gewijzigd bij de richtlijn 96/56/EG van het Europees Parlement en de Raad van 3 september 1996;

Gelet op de richtlijn 94/69/EG van de Commissie van 19 december 1994 tot eenentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen;

Vu la directive 96/54/CE de la Commission du 30 juillet 1996 portant vingt-deuxième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses;

Vu l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989, du 19 juillet 1994 et du 13 novembre 1997, ainsi que l'arrêté royal du 14 septembre 1993 portant désignation des services et fonctionnaires chargés de rechercher et de constater les infractions aux dispositions de l'arrêté royal du 24 mai 1982 précité;

Vu l'arrêté royal du 27 octobre 1988 relatif à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques ainsi que l'arrêté royal du 14 novembre 1993 relatif à la protection des animaux d'expérience;

Vu l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995, et l'arrêté royal du 14 juillet 1998;

Vu l'avis du Conseil supérieur pour la Prévention et la Protection au Travail du 16 octobre 1998;

Vu les lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, notamment l'article 3, § 1<sup>er</sup>, modifié par les lois des 9 août 1980, 16 juin 1989 et 4 juillet 1989;

Vu l'urgence;

Considérant qu'il convient de transposer, sans retard, la directive 94/69/CE du 19 décembre 1994 dont le délai de transposition est dépassé depuis le 1<sup>er</sup> septembre 1996 et la directive 96/54/CE du 30 juillet 1996 dont le délai de transposition est dépassé en partie depuis le 31 octobre 1997 et pour le reste depuis le 31 mai 1998.

Considérant que la Cour de Justice des Communautés européennes a condamné la Belgique, le 6 octobre 1998, en raison de non transposition de la directive 94/69/CE du 19 décembre 1994 dans l'Affaire C-79/98;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Santé publique, de Notre Ministre de l'Emploi et du Travail et de Notre Secrétaire d'Etat à l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

**Article 1<sup>er</sup>.** Les annexes de l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989, 19 juillet 1994 et 13 novembre 1997 sont modifiées comme suit :

- L'annexe I est remplacée par l'annexe I du présent arrêté;
- L'annexe V, point B, est modifiée comme suit :

a) Le texte de l'annexe II, point A, du présent arrêté remplace le titre et l'introduction générale de la partie B : "Méthodes pour la détermination de la toxicité".

b) Le texte de l'annexe II, point B, du présent arrêté est inséré après le point B.1bis.

c) Le texte de l'annexe II, point C, du présent arrêté remplace le point B.6.

d) Le texte de l'annexe II, point D, du présent arrêté remplace le point B.7.

e) Le texte de l'annexe II, point E, du présent arrêté est ajouté à la fin.

- Le texte de l'annexe III du présent arrêté remplace le texte indiqué à l'annexe VI.

**Art. 2.** Notre Ministre de la Santé publique, Notre Ministre de l'Emploi et du Travail et Notre Secrétaire d'Etat à l'Environnement sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,

M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,

Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,

J. PEETERS

Gelet op de richtlijn 96/54/EG van de Commissie van 30 juli 1996 tot tweeëntwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijk stoffen;

Gelet op het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989, van 19 juli 1994 en van 13 november 1997, alsook op het koninklijk besluit van 14 september 1993 tot aanstelling van de diensten en ambtenaren belast met het opsporen en vaststellen van de inbreuken op de bepalingen van voormeld koninklijk besluit van 24 mei 1982;

Gelet op het koninklijk besluit van 27 oktober 1988 betreffende de toepassing van het in de beginselen van goede laboratoriumpraktijken en het toezicht op de uitvoering ervan bij proeven op scheikundige stoffen alsook op het koninklijk besluit van 14 november 1993 betreffende de bescherming van proefdieren;

Gelet op het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995, en het koninklijk besluit van 14 juli 1998;

Gelet op het advies van de Hoge Raad voor Preventie en Bescherming op het Werk van 16 oktober 1998;

Gelet op de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, inzonderheid op artikel 3, § 1, gewijzigd door de wetten van 9 augustus 1980, 16 juni 1989 en 4 juli 1989;

Gelet op de dringende noodzakelijkheid;

Overwegende dat richtlijn 94/69/EG van 19 december 1994, waarvan de omzettingstermijn verstreken is sedert 1 september 1996 en richtlijn 96/54/EG van 30 juli 1996 waarvan de omzettingstermijn verstreken is, deels sedert 31 oktober 1997 en voor het overige sedert 31 mei 1998, onverwijld moeten worden omgezet.

Overwegende dat het Hof van Justitie van de Europese Gemeenschappen op 6 oktober 1998 België heeft veroordeeld wegens niet omzetting van de richtlijn 94/69/EG van 19 december 1994 in de Zaak C-79/98;

Op de voordracht van Onze Minister van Volksgezondheid, van Onze Minister van Tewerkstelling en Arbeid en van Onze Staatssecretaris voor Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

**Artikel 1.** De bijlagen van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989, 19 juli 1994 en 13 november 1997 worden als volgt gewijzigd :

- Bijlage I wordt vervangen door bijlage I bij dit besluit;
- Bijlage V, deel B, wordt als volgt gewijzigd :

a) De tekst in bijlage II, onder A, van dit besluit vervangt de titel en de algemene inleiding van deel B "Methoden voor de bepaling van de toxiciteit".

b) De tekst in bijlage II, onder B, van dit besluit wordt ingevoegd na hoofdstuk B.1 bis.

c) De tekst in bijlage II, onder C, van dit besluit vervangt hoofdstuk B.6.

d) De tekst in bijlage II, onder D, van dit besluit vervangt hoofdstuk B.7.

e) De tekst in bijlage II, onder E, van dit besluit wordt toegevoegd.

- De tekst in bijlage III van dit besluit vervangt de aangegeven tekst van bijlage VI.

**Art. 2.** Onze Minister van Volksgezondheid, Onze Minister van Tewerkstelling en Arbeid en Onze Staatssecretaris voor Leefmilieu zijn, ieder wat hem betreft, belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,

M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,

Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,

J. PEETERS

## Annexe I

## Liste des substances dangereuses

La liste des substances dangereuses, mentionnée à cette annexe, est identique à celle qui figure à l'annexe III, partie I de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995, et l'arrêté royal du 14 juillet 1998.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS

## Annexe II A

## « PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ ET DES AUTRES EFFETS SUR LA SANTÉ

## INTRODUCTION GÉNÉRALE: PARTIE B

## A. NOTE EXPLICATIVE

Pour la présente introduction, la numérotation est la suivante:

- B.15 Mutation génique, *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16 Recombinaison mitotique, *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17 Cellules de mammifère in vitro, essai de mutation génique
- B.18 Lésion et réparation de l'ADN - synthèse non programmée de l'ADN (UDS) cellules de mammifère in vitro
- B.19 Essai in vitro d'échange de chromatides sœurs
- B.20 Test de létalité récessive liée au sexe chez *Drosophila melanogaster*
- B.21 Tests de transformation sur cellules de mammifère in vitro
- B.22 Tests de létalité dominante chez le rongeur
- B.23 Test cytogénétique sur cellules germinales de mammifère in vivo
- B.24 Spot test chez la souris
- B.25 Translocation héréditaire chez la souris
- B.26 Toxicité orale subchronique: étude de 90 jours sur des rongeurs
- B.27 Toxicité orale subchronique: étude de 90 jours sur des espèces n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs
- B.28 Toxicité dermique subchronique: étude de 90 jours sur des rongeurs
- B.29 Toxicité subchronique par inhalation: étude de 90 jours sur des rongeurs
- B.30 Étude de la toxicité chronique
- B.31 Étude de tératogénicité
- B.32 Étude de cancérogénèse
- B.33 Étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité
- B.34 Test de reproduction sur une génération
- B.35 Test de reproduction sur deux générations
- B.36 Toxicocinétique

## B. DÉFINITIONS GÉNÉRALES DES TERMES EMPLOYÉS DANS LES MÉTHODES D'ESSAI FIGURANT DANS LA PRÉSENTE ANNEXE

i) La toxicité aiguë correspond aux effets indésirables qui se manifestent dans un intervalle de temps donné (généralement 14 jours) après administration d'une dose unique d'une substance.

ii) La toxicité évidente est un terme général qui décrit les signes manifestes de toxicité résultant de l'administration d'une substance d'essai. Ces signes doivent être suffisamment marqués pour permettre une évaluation des dangers et sont tels qu'une augmentation de la dose administrée est susceptible d'entraîner des effets toxiques graves et éventuellement la mort.

iii) La dose est la quantité de substance administrée. Elle est exprimée en poids (gramme et milligramme) ou en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, milligrammes par kilogramme de poids corporel), ou encore en concentration alimentaire constante (parties par million ou milligrammes par kilogramme d'aliment).

iv) La dose discriminante est la plus forte des quatre doses fixées pouvant être administrée sans entraîner une mortalité liée à la substance (y compris animaux sacrifiés pour raisons humanitaires).

v) Le dosage est un terme général qui comprend la dose administrée, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.

vi) La  $DL_{50}$  (dose létale médiane) est la dose unique d'une substance, calculée statistiquement, censée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels elle est administrée. La  $DL_{50}$  est exprimée en poids de la substance étudiée par unité de poids corporel de l'animal soumis à l'expérimentation (milligrammes par kilogramme).

vii) La  $CL_{50}$  (concentration létale moyenne) est la concentration d'une substance, calculée statistiquement, susceptible de provoquer, lors d'une exposition ou dans un laps de temps donné après exposition, la mort de 50 % des animaux exposés pendant une durée déterminée. La  $CL_{50}$  est exprimée en poids de la substance étudiée rapporté à un volume standard d'air (milligrammes par litre).

viii) La NOAEL est l'abréviation de l'anglais « no observed adverse effect level » : (dose sans effet indésirable observé) et correspond à la dose ou au niveau d'exposition maximum auquel aucun effet adverse lié au traitement n'est observé.

ix) La toxicité subchronique par administration répétée correspond aux effets indésirables qui se manifestent chez les animaux d'expérience qui reçoivent une administration quotidienne d'une substance chimique ou qui sont exposés quotidiennement à cette substance pendant une période brève par rapport à leur espérance de vie.

x) La dose maximale tolérée (DMT) est la plus forte dose provoquant des signes de toxicité chez les animaux sans entraîner d'effet majeur sur leur survie en ce qui concerne l'essai dans lequel elle est utilisée.

xi) L'irritation cutanée correspond aux modifications cutanées de nature inflammatoire qui apparaissent après application d'une substance sur la peau.

xii) L'irritation des yeux correspond aux modifications oculaires qui apparaissent après application d'une substance sur la surface antérieure de l'œil.

xiii) La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée d'origine immunologique à une substance.

xiv) La corrosion dermique désigne les lésions cutanées irréversibles qui résultent de l'application d'une substance sur la peau pendant une période comprise entre 3 minutes et 4 heures.

xv) La toxicocinétique est l'étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances étudiées.

xvi) L'absorption est le(s) processus par le(s)quel(s) une substance administrée pénètre dans l'organisme.

xvii) L'excrétion est le(s) processus par le(s)quel(s) la substance administrée et/ou ses métabolites sont éliminés de l'organisme.

xviii) La distribution est le(s) processus par le(s)quel(s) la substance absorbée et/ou ses métabolites se répartissent dans l'organisme.

xix) Le métabolisme est le(s) processus par le(s)quel(s) la substance administrée subit dans l'organisme des réactions enzymatiques ou non qui aboutissent à des modifications de sa structure.

#### B.I Toxicité aiguë - toxicité par administration répétée/toxicité subchronique et chronique

Divers essais (méthodes B.1 - B.5) permettent d'évaluer les effets toxiques et la toxicité aiguë d'une substance pour l'ensemble de l'organisme ou pour certains organes; suite à l'administration d'une dose unique, ces essais fournissent une première indication de la toxicité de la substance.

En fonction de la toxicité de la substance, on peut envisager un essai limite jusqu'à une étude complète menant à l'établissement d'une  $DL_{50}$ , bien qu'aucun essai limite ne soit prescrit pour les études par inhalation puisqu'il n'a pas été possible de définir une valeur limite unique pour l'exposition par inhalation.

La préférence doit être accordée aux méthodes qui utilisent le moins d'animaux possible et qui minimisent les souffrances de ces derniers, par exemple, la « méthode des doses fixes » : (méthode B.1 bis) et la « méthode de toxicité aiguë » : (méthode B.1 ter). Pour les essais de niveau 1, une étude sur une seconde espèce peut compléter les conclusions de la première étude. Dans ce cas, on utilisera une méthode d'essai standard ou on adaptera la méthode pour un plus petit nombre d'animaux.

L'essai de toxicité par administration répétée (méthodes B.7, B.8 et B.9) comporte une évaluation des effets toxiques résultant d'une exposition répétée. L'observation clinique des animaux doit être minutieuse, afin de recueillir le maximum d'informations possible. Ces essais doivent permettre de déterminer la toxicité sur les organes cibles, ainsi que les doses non toxiques. Ces aspects pourront nécessiter une analyse plus approfondie dans les études à long terme (méthodes B.26 - B.30 et B.33).

#### B.II Mutagénicité - Génotoxicité

La mutagénicité concerne l'induction de modifications permanentes et transmissibles, la quantité ou la structure du matériel génétique des cellules ou des organismes. Ces modifications ou « mutations » : peuvent concerner un gène unique ou des segments d'un gène, un bloc de gènes ou des chromosomes entiers. Les effets sur les chromosomes (entiers) peuvent être structurels et/ou numériques.

L'activité mutagène d'une substance est évaluée à l'aide d'essais in vitro, sur des bactéries (méthode B.13/14) pour les mutations géniques (ponctuelles), et/ou sur des cellules de mammifères pour les aberrations chromosomiques structurelles (méthode B.10).

Les méthodes in vivo sont également acceptables, par exemple l'essai du micronoyau (méthode B.12) ou l'analyse de métaphase de cellules de moelle osseuse (méthode B.11). Néanmoins, et en l'absence de contre-indication, les méthodes in vitro sont nettement préférables.

Les gros volumes de production peuvent nécessiter des études complémentaires pour préciser le potentiel mutagène d'une substance ou effectuer des essais préliminaires de dépistage d'un éventuel effet cancérigène, et/ou réaliser ou assurer le suivi de l'évaluation des risques et ces études peuvent avoir plusieurs utilités : confirmer les résultats des essais de base, analyser des critères non étudiés (end-points) dans les essais de base, servir de point de départ ou de complément à des études in vivo.

A cet effet, les méthodes B.15 à B.25 utilisent des systèmes eucaryotes in vivo et in vitro et portent sur une plus large série de systèmes biologiques. Ces essais fournissent des informations sur les mutations ponctuelles et sur d'autres critères chez des organismes plus complexes que les bactéries utilisées dans les essais de base.

En règle générale, lorsqu'un programme complémentaire d'études de mutagenicité est envisagé, celui-ci doit être conçu pour permettre l'obtention d'informations complémentaires pertinentes sur le potentiel mutagène ou cancérigène de la substance en question.

Les études qui s'avèrent nécessaires dans un cas précis dépendent de nombreux facteurs, notamment des caractéristiques physiques et chimiques de la substance, des résultats des premiers essais bactériens et cytogénétiques, du profil métabolique de la substance, des résultats d'autres études de toxicité et des utilisations connues de la substance. Étant donné la diversité des facteurs à prendre en considération, un schéma rigide de sélection des essais ne semble pas opportun.

L'A.R. du 13 novembre 1997 définit certains principes généraux en matière de stratégie, mais un document, le guide technique pour l'Évaluation des Risques présente des stratégies précises qui sont néanmoins souples et peuvent être adaptées en fonction des circonstances.

Les méthodes d'études complémentaires ont néanmoins été regroupées ci-après, en fonction du principal paramètre (end-point) génétique analysé.

Études portant sur les mutations géniques (ponctuelles)

a) Études des mutations directes ou inverses sur micro-organismes eucaryotes (*Saccharomyces cerevisiae*) (méthode B.15)

b) Études in vitro des mutations directes sur cellules de mammifère (méthode B.17)

c) Test de létalité récessive liée au sexe sur *Drosophila melanogaster* (méthode B.20)

d) Test de mutation génétique sur cellules somatique in vivo, test des taches chez la souris (spot test - méthode B.24)

Études portant sur les aberrations chromosomiques

a) Études cytogénétiques in vivo chez les mammifères; une analyse en métaphase des cellules de moelle osseuse in vivo doit être envisagée lorsqu'elle n'a pas été réalisée lors de l'évaluation initiale (méthode B.11). Il est en outre possible d'étudier la cytogénétique des cellules germinales in vivo (méthode B.23)

b) Études cytogénétiques in vitro sur cellules de mammifère, lorsqu'elles n'ont pas été réalisées lors de l'évaluation initiale (méthode B.10)

c) Études de létalité dominante chez les rongeurs (méthode B.22)

d) Test de translocation héréditaire chez la souris (méthode B.25)

Effets génotoxiques - effets sur l'ADN

La génotoxicité, caractérisée par des altérations potentielles du matériel génétique non nécessairement liées à la mutagenicité, peut se manifester par des lésions de l'ADN sans preuve directe de mutation. Les méthodes ci-après qui utilisent des micro-organismes eucaryotes ou des cellules de mammifère peuvent s'avérer utiles pour étudier ces phénomènes :

a) Recombinaison mitotique sur *Saccharomyces cerevisiae* (méthode B.16)

b) Lésion et réparation de l'ADN - synthèse non programmée de l'ADN sur cellules de mammifère - in vitro (méthode B.18)

c) Échange de chromatides sœurs sur cellules de mammifère - in vitro (méthode B.19)

Méthodes alternatives pour la recherche du potentiel cancérigène

Des tests de transformation sur cellules de mammifère permettent de mesurer la capacité d'une substance à induire, dans une culture cellulaire, des modifications morphologiques et comportementales qui sont supposées être associées à une transformation maligne in vivo (méthode B.21). Un certain nombre de types cellulaires et de critères de transformation différents peuvent être utilisés.

Évaluation du risque d'effets héréditaires chez les mammifères

Il existe plusieurs méthodes qui permettent de mesurer, chez les mammifères, les effets héréditaires induits par des mutations géniques (ponctuelles), par exemple, le test du locus spécifique chez la souris qui permet de mesurer les mutations intervenues sur les cellules germinales dans la première génération (non décrit dans la présente annexe), ou par des aberrations chromosomiques, par exemple, le test de translocation héréditaire chez la souris (méthode B.25). Ces méthodes peuvent être utilisées pour apprécier le risque génétique que peut présenter une substance pour l'homme. Toutefois, étant donné la complexité de ces essais et le nombre élevé d'animaux requis, en particulier pour le test du locus spécifique, ces études ne doivent être entreprises que lorsqu'elles sont pleinement justifiées.

### B.III Cancérogénicité

Les substances chimiques peuvent être considérées comme des agents cancérigènes génotoxiques ou non génotoxiques, selon le mécanisme d'action présumé.

Les études de mutagenicité/génotoxicité peuvent fournir des informations préalables permettant de dépister le potentiel cancérigène génotoxique d'une substance. Des informations complémentaires seront fournies par les essais de toxicité par administration répétée, de toxicité subchronique ou de toxicité chronique. L'essai de toxicité par administration répétée, méthode B.7 et les études de toxicité à plus long terme comprennent une évaluation des modifications histopathologiques observées, par exemple de l'hyperplasie de certains tissus, qui peuvent être inquiétantes. Ces études ainsi que les informations toxicocinétiques peuvent aider à mettre en évidence les substances chimiques ayant un potentiel cancérigène qui pourrait alors être approfondi dans le cadre d'un essai de cancérogénicité (méthode B.32) ou souvent d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité (méthode B.33).

#### B.IV Toxicité pour la reproduction

La toxicité pour la reproduction peut se manifester de différentes façons, notamment par des troubles de la fonction ou de la capacité reproductrice mâle ou femelle, qualifiés d'« effet sur la fertilité » ; ou par l'apparition d'effets néfastes non transmissibles chez les descendants, qualifiés de «\*toxicité pour le développement\*» : qui englobe également la tératogénicité et les effets durant l'allaitement.

Pour les études de tératogénicité qui font partie de l'étude de la toxicité pour le développement, la méthode d'essai (méthode B.31) porte principalement sur l'administration par voie orale. D'autres voies d'administration sont également possibles en fonction des propriétés physiques de la substance d'essai ou de la voie probable d'exposition humaine. Dans de tels cas, la méthode d'essai doit être convenablement adaptée en tenant compte des éléments pertinents des méthodes d'essai sur 28 jours.

Lorsqu'une étude de la reproduction sur trois générations (fertilité) s'avère nécessaire, il est possible d'utiliser la méthode décrite pour le test de reproduction sur deux générations (méthode B.35) en l'appliquant à une troisième génération.

#### B.V Neurotoxicité

La neurotoxicité peut se manifester de différentes façons, à savoir par des modifications fonctionnelles et/ou structurelles et par des modifications biochimiques au niveau du système nerveux central ou périphérique. Les essais de toxicité aiguë peuvent donner une première indication de la neurotoxicité. L'essai de toxicité par administration répétée, méthode B.7, comporte une évaluation des effets neurotoxiques; l'observation clinique des animaux doit donc être particulièrement minutieuse, afin de fournir le maximum de renseignements possible. La méthode doit permettre de mettre en évidence les substances chimiques ayant un potentiel neurotoxique qui pourrait nécessiter d'autres études plus approfondies. Il importe en outre d'étudier la capacité des substances à produire des effets neurotoxiques spécifiques qui ne seraient pas détectés par d'autres études de toxicité. Certaines substances organophosphorées, par exemple, ont une neurotoxicité différée que les méthodes B.37 et B.38 permettent d'évaluer, après administration unique ou administration répétée.

#### B.VI Immunotoxicité

L'immunotoxicité peut se manifester de différentes façons, notamment par une immunosuppression et/ou un renforcement de la réponse immunitaire entraînant soit une hypersensibilité soit une auto-immunité induite. L'essai de toxicité par administration répétée, méthode B.7, comporte une évaluation des effets immunotoxiques. Cette méthode doit permettre de mettre en évidence les substances chimiques ayant un potentiel immunotoxique qui pourrait nécessiter d'autres études plus approfondies.

#### B.VII Toxicocinétique

Les études toxicocinétiques facilitent l'interprétation et l'évaluation des données de toxicité. Elles ont pour objet d'élucider certains aspects particuliers de la toxicité de la substance chimique étudiée, et leurs résultats peuvent aider à concevoir d'autres études de toxicité. Il n'est pas envisagé de déterminer l'ensemble des paramètres dans tous les cas; la séquence complète des études toxicocinétiques (absorption, excrétion, distribution et métabolisme) n'est nécessaire que dans de rares cas. Pour certains composés, des modifications de cette séquence peuvent être souhaitables, ou une étude par administration unique peut s'avérer être suffisante (méthode B.36).

Les informations concernant la structure chimique (RSA) et les propriétés physico-chimiques peuvent également fournir des renseignements sur les caractéristiques d'absorption par la voie d'administration prévue, ainsi que sur les possibilités de transformation et de distribution dans les tissus. Des études de toxicité et des études toxicocinétiques antérieures peuvent aussi fournir des informations sur les paramètres toxicocinétiques.

### C. CARACTÉRISATION DE LA SUBSTANCE À TESTER

Avant d'entreprendre toute étude de toxicité, il faut connaître la composition de la substance à tester, y compris les principales impuretés, ainsi que ses propriétés physico-chimiques dont sa stabilité.

Les propriétés physico-chimiques de la substance fournissent des informations importantes pour le choix de la voie d'administration, pour la conception des différentes études, ainsi que pour la manipulation et le stockage de la substance.

La mise au point d'une méthode d'analyse permettant une évaluation qualitative et quantitative de la substance à tester (y compris, si possible, de ses principales impuretés) dans le véhicule d'administration et dans le matériel biologique doit précéder la mise en œuvre de l'étude.

Toutes les informations concernant l'identification, les propriétés physico-chimiques, la pureté et le comportement de la substance à tester doivent être consignées dans le procès-verbal d'essai.

### D. SOIN DES ANIMAUX

Lors des essais de toxicité, il est essentiel de procéder à des contrôles stricts des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques appropriées de soin des animaux.

#### i) Conditions d'hébergement

Les conditions ambiantes dans les locaux ou enceintes réservés aux animaux d'expérience doivent être adaptées à l'espèce utilisée pour l'essai. Pour les rats, les souris et les cobayes, la température ambiante doit être de  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins, la température doit être de  $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  et l'humidité relative de 30 à 70 %.

Certaines techniques expérimentales sont particulièrement sensibles aux effets thermiques et dans de tels cas, des indications précises concernant les conditions adéquates figurent dans la description de la méthode d'essai. Dans tous les essais de toxicité, la température et l'humidité doivent être contrôlées et consignées, et doivent figurer dans le rapport final d'étude.

Un éclairage artificiel doit garantir l'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les détails concernant les conditions d'éclairage doivent être consignés dans le rapport final d'étude.

Sauf si la méthode prévoit d'autres conditions, les animaux doivent être hébergés individuellement ou mis en cage par petits groupes de même sexe. Les cages collectives ne doivent pas contenir plus de cinq animaux.

Il est important que les comptes rendus d'expérimentation animale précisent le type de cage utilisé et le nombre d'animaux par cage lors de l'exposition à la substance chimique et pendant toute période d'observation qui suit.

#### ii) Conditions d'alimentation

Le régime alimentaire doit répondre à tous les besoins nutritionnels de l'espèce soumise à l'expérience. Lorsque les substances à tester sont administrées dans la nourriture, il se peut que la valeur nutritionnelle de cette dernière soit amoindrie par une interaction entre la substance et un ingrédient de l'alimentation. Cette éventualité doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai. Les régimes alimentaires classiquement utilisés en laboratoire sont acceptables, l'eau de boisson étant fournie à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être guidé par la nécessité de garantir une proportion appropriée de substance en cas d'administration par cette méthode.

Les contaminants alimentaires qui agissent sur la toxicité ne doivent pas être présents à des concentrations susceptibles d'influencer les résultats.

### E. BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX

Le bien-être des animaux est dûment pris en compte lors de l'élaboration des méthodes d'essai. Quelques exemples sont brièvement cités ci-après, mais cette liste n'est pas exhaustive. Pour connaître les règles et/ou conditions exactes, il faut se référer à l'énoncé des méthodes.

- Pour la détermination de la toxicité orale aiguë, deux méthodes sont envisageables : la « méthode des doses fixes » : et la « méthode de classe de toxicité aiguë » :. La méthode des doses fixes n'utilise pas la mort comme critère spécifique d'évaluation de la toxicité, et nécessite moins d'animaux. La méthode de la classe de toxicité aiguë utilise en moyenne 70 % d'animaux en moins que la méthode B.1 pour la toxicité orale aiguë. Ces deux méthodes entraînent moins de souffrances et de détresse que la méthode classique.

- Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum scientifiquement acceptable : cinq animaux de même sexe seulement sont testés par dose pour les méthodes B.1 et B.3; 10 animaux seulement (et 5 seulement pour le groupe témoin négatif) sont utilisés pour déterminer la sensibilisation cutanée par la méthode de maximalisation chez le cobaye (méthode B.6); le nombre d'animaux nécessaires comme témoins positifs pour étudier la mutagénicité in vivo est également réduit (méthodes B.11 et B.12).

- La souffrance et la détresse des animaux pendant les essais sont minimisées : les animaux présentant des signes de souffrance et de détresse intenses et persistantes pourront être euthanasiés; il n'est pas nécessaire d'administrer les substances connues pour provoquer une détresse et une souffrance intenses du fait des propriétés corrosives ou irritantes de la substances (méthodes B.1, B.2 et B.3).

- Les essais limite évitent d'avoir à tester des doses inutilement élevées, tant pour les essais de toxicité aiguë (méthode B.1, B.2 et B.3) que pour les essais de mutagénicité in vivo (méthodes B.11 et B.12).

- Une stratégie relative à la détermination des propriétés irritantes permet désormais de ne pas réaliser l'essai ou de le limiter à un seul animal lorsque des éléments scientifiques probants peuvent être fournis.

Ces éléments scientifiques peuvent être basés sur les propriétés physico-chimiques de la substance, sur les résultats d'autres essais antérieurs, ou sur les résultats d'essais in vitro dûment validés. Par exemple, si une substance a fait l'objet d'une étude de toxicité aiguë par exposition cutanée à la dose limite (méthode B.3) et qu'aucune irritation cutanée n'a été observée, il n'est peut être pas utile d'effectuer d'autres essais d'irritation cutanée (méthode B.4); les produits qui se sont révélés nettement corrosifs ou responsables d'une irritation cutanée grave à la suite d'une étude d'irritation cutanée (méthode B.4) ne doivent pas faire l'objet d'essais complémentaires d'irritation oculaire (méthode B.5).

### F. MÉTHODES ALTERNATIVES

Un des objectifs scientifiques de l'Union européenne est de mettre au point et de valider des méthodes alternatives qui fournissent autant d'informations que les expérimentations animales actuelles, mais qui nécessitent moins d'animaux, minimisent leurs souffrances et permettent d'éviter leur sacrifice.

Dès que de telles méthodes sont disponibles, elles doivent être envisagées, chaque fois que cela est possible, pour la caractérisation des dangers et pour la classification et l'étiquetage des substances en fonction des dangers intrinsèques.

### G. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

L'extrapolation directe à l'homme des résultats des expériences sur les animaux et des essais in vitro n'est possible que dans certaines limites; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais; aussi, lorsque des effets indésirables ont été mis en évidence chez l'homme, ces données peuvent être utilisées pour confirmer les résultats expérimentaux.

Ces résultats sont utilisables pour la classification et l'étiquetage des produits chimiques nouveaux ou existants pour leurs effets sur la santé humaine sur la base de leurs propriétés intrinsèques mis en évidence et quantifiés par les méthodes préconisées. Les critères correspondants de classification et d'étiquetage figurant à l'annexe VI font également référence aux critères d'évaluation des protocoles d'essais de ces méthodes.

Ces résultats peuvent aussi être utilisés pour les études d'évaluation des risques des produits chimiques nouveaux ou existants, et des stratégies d'essai appropriées sont proposées dans les documents guides correspondants.

### H. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

La plupart des méthodes présentées ici sont élaborées dans le cadre du programme de lignes directrices de l'OCDE en matière d'essais. Ces méthodes doivent être mises en œuvre conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire, afin de garantir l'acceptation mutuelle des données.

De plus amples informations peuvent être obtenues dans les références citées dans les lignes directrices de l'OCDE et dans d'autres publications pertinentes. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS

Annexe II B

« B.1ter TOXICITÉ (ORALE) AIGUË - MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La méthode de la classe de toxicité aiguë fournit des informations à la fois pour l'évaluation des risques et pour la classification des substances.

La méthode utilise trois doses fixes suffisamment distinctes pour permettre la classification de la substance en fonction des résultats de l'étude. En outre, le protocole décrit permet de choisir trois doses supplémentaires qui peuvent être utilisées à certains stades de décision ou pour la poursuite de l'essai. L'utilisation d'une de ces doses supplémentaires peut être envisagée lorsqu'une analyse plus fine s'avère souhaitable ou nécessaire.

La méthode utilise des doses de départ définies; l'objectif n'est pas de calculer une DL<sub>50</sub> précise, mais de déterminer une plage d'exposition susceptible d'entraîner la mort, puisque la mort d'une certaine proportion d'animaux reste le principal critère d'évaluation de cet essai. Les résultats de l'essai doivent permettre une classification selon les critères de l'annexe VI. Du fait de l'approche séquentielle, la durée de l'essai peut être supérieure à celle indiquée dans la méthode B.1. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle nécessite moins d'animaux que la méthode de toxicité (orale) aiguë (B.1) et que la méthode alternative de la dose fixe (B.1bis).

Voir également l'introduction générale, partie B.

1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

1.3. Principe de la méthode d'essai

Une des doses prédéterminées de la substance est administrée oralement à un groupe d'animaux d'expérience. La substance est testée par étapes, chacune des étapes nécessitant trois animaux du même sexe. Il n'est pas nécessaire de procéder à une étude d'observation préliminaire. Selon qu'une mortalité liée à la substance est ou non constatée chez les animaux traités, l'essai se poursuivra comme suit :

- l'essai ne sera pas poursuivi,
- l'étape suivante sera réalisée à la même dose, mais sur des animaux de l'autre sexe,
- l'étape suivante sera réalisée à la dose immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure.

1.4. Description de la méthode d'essai

1.4.1. Préparation

Des animaux adultes jeunes et sains sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification et maintenus dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai, afin de leur permettre de s'acclimater aux conditions régnant dans le laboratoire. Les animaux peuvent être regroupés dans les cages par sexe et par dose, mais le nombre d'animaux par cage doit toujours permettre une observation aisée de chaque animal.

La substance à tester est administrée aux animaux en une seule fois, par gavage à l'aide d'une sonde œsophagienne ou d'une canule pour intubation appropriée.

Si nécessaire, la substance à tester est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Chaque fois que possible, on utilisera de préférence une solution/suspension aqueuse, ou sinon une solution/émulsion dans l'huile (par exemple, huile de maïs) ou éventuellement une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule utilisé n'est pas aqueux, ses caractéristiques toxiques doivent être connues ou être déterminées avant l'essai.

Les animaux sont mis à la diète avant l'administration de la substance (la veille au soir pour le rat et pendant 3-4 heures pour la souris), mais sans les priver d'eau.

1.4.2. Conditions de l'essai

1.4.2.1. Animaux d'expérience

Sauf indication contraire, le rat est l'espèce de prédilection en ce qui concerne les rongeurs. Les femelles doivent être nullipares et non gravides.



Au début de l'étude, l'écart de poids entre les animaux doit être minime et ne pas dépasser  $\pm 20$  pour cent du poids moyen pour chaque sexe.

#### 1.4.2.2. Nombre et sexe

Trois animaux de même sexe sont utilisés pour chaque étape. Le choix du sexe est indifférent pour la première étape.

#### 1.4.2.3. Doses

La dose de départ à utiliser est choisie parmi l'une des trois doses fixes, à savoir 25, 200 et 2 000 mg/kg de poids corporel. La dose de départ doit être celle qui est la plus susceptible d'entraîner la mort d'au moins certains des animaux traités. En fonction de la dose de départ, on pourra utiliser un des modes opératoires représentés sous forme de diagrammes à l'annexe I.

Pour sélectionner le sexe et la dose de départ, toutes les informations disponibles doivent être utilisées, y compris les données concernant la relation structure-activité. Lorsque les informations suggèrent qu'une mortalité est improbable à la dose la plus élevée (2 000 mg/kg p.c.), il y a lieu d'effectuer un essai de limite. En l'absence d'informations sur une substance à tester, il est recommandé, pour des motifs ayant trait au bien-être des animaux, d'utiliser la dose de départ de 200 mg/kg p.c.

Il peut être souhaitable d'obtenir des informations plus précises que celles fournies par l'essai aux trois doses fixes de 25, 200 et 2 000 mg/kg p.c. Dans ce cas, il est possible de poursuivre l'essai en utilisant des doses fixes supplémentaires de 5, 50 ou 500 mg/kg p.c.

Il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles entraîneront une souffrance et une détresse importantes, du fait des propriétés corrosives ou très irritantes de la substance.

Le laps de temps qui s'écoule entre le traitement des différents groupes est fonction de la date d'apparition, de la durée et de la gravité des signes de toxicité observés. Le traitement des animaux de l'autre sexe ou le traitement par la dose supérieure seront différés jusqu'à ce que l'on se soit assuré de la survie des animaux précédemment traités.

#### 1.4.2.4. Essai limite

Il est possible d'effectuer un essai limite à la dose de 2 000 mg/kg p.c. sur trois animaux de chaque sexe. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut s'avérer nécessaire de poursuivre l'essai à la dose de 200 mg/kg p.c. (ou 500 mg/kg p.c.).

#### 1.4.2.5. Période d'observation

Les animaux sont normalement observés pendant 14 jours, à moins qu'ils ne meurent avant ou qu'il ne soit nécessaire de les exclure de l'étude et de les sacrifier par euthanasie pour abrégier leurs souffrances. La durée de la période d'observation ne doit toutefois pas être fixée de façon rigide; elle doit être déterminée en fonction des effets toxiques, de leur date d'apparition et de la durée de la période de récupération, et peut donc être prolongée si nécessaire. Le moment où les signes de toxicité apparaissent et celui où ils disparaissent sont importants, en particulier si ces signes ont tendance à apparaître tardivement. Toutes les observations sont systématiquement consignées et une fiche individuelle est établie pour chaque animal.

#### 1.4.3. Mode opératoire

Après la période de jeûne, les animaux sont pesés préalablement à l'administration de la substance. Une fois la substance administrée, les animaux peuvent être privés de nourriture pendant une nouvelle période de 3-4 heures. Lorsqu'une dose est administrée en plusieurs fois sur une période donnée, il peut être nécessaire, suivant la durée de cette période, de nourrir et d'abreuver les animaux.

Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Chez les rongeurs, ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel; toutefois, cette limite peut être portée à 2 ml/100 g de poids corporel dans le cas des solutions aqueuses. Pour minimiser la variabilité du volume d'essai, les concentrations doivent être adaptées de manière que toutes les doses soient administrées à volume constant. Si l'administration en une dose unique n'est pas possible, la dose peut être fractionnée en plusieurs prises sur une période ne dépassant pas 24 heures.

Le mode opératoire détaillé figure à l'annexe I.

##### 1.4.3.1. Observation générale

Une observation clinique détaillée doit être effectuée à deux reprises au moins le jour de l'administration ou davantage si la réaction des animaux le nécessite, et au moins une fois par jour par la suite. Les animaux retrouvés à l'état moribond et ceux qui présentent des signes de souffrance et de détresse intenses et persistants doivent être euthanasiés. Les animaux sacrifiés pour ces motifs sont pris en compte de la même façon que les animaux qui succombent au cours de l'essai.

Lorsque des animaux sont sacrifiés pour des raisons humanitaires ou sont retrouvés morts, le moment de leur mort doit être noté aussi précisément que possible. Des observations complémentaires sont nécessaires si les animaux continuent de présenter des signes de toxicité. Ces observations doivent porter sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Il convient d'être particulièrement attentifs aux manifestations telles que tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma.

Toutes les observations sont systématiquement consignées, et une fiche individuelle est établie pour chaque animal.

##### 1.4.3.2. Poids corporel

Tous les animaux doivent être pesés peu de temps avant l'administration de la substance à tester, et au moins une fois par semaine par la suite. Les variations du poids doivent être calculées et consignées. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés avant d'être euthanasiés.

##### 1.4.3.3. Autopsie

Tous les animaux d'expérience, y compris ceux qui sont morts pendant l'essai ou qui ont été retirés de l'étude, sont soumis à une autopsie. Pour chaque animal, toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être consignées. Un examen microscopique des organes présentant des signes de pathologie à l'examen macroscopique peut être envisagé pour les animaux ayant survécu au minimum 24 heures, car il peut fournir des informations utiles.

## 2. RÉSULTATS

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou sacrifiés pour des raisons humanitaires, le moment de la mort de chaque animal, la description des effets toxiques, leur période d'apparition et leur évolution, ainsi que les résultats de l'autopsie.

Des indications générales concernant l'interprétation des résultats en vue de la classification figurent à l'annexe 2.

## 3. COMPTE RENDU

Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants :

Animaux d'expérience :

- espèce/souche,
- état des animaux, sur le plan microbiologique, si informations à ce sujet,
- nombre d'animaux, âge et sexe,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai, à intervalles d'une semaine par la suite et à la fin de l'essai.

Conditions expérimentales :

- justification du choix du véhicule si autre que de l'eau,
- détails concernant l'administration de la substance, y compris les volumes administrés et le moment de l'administration,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (type/origine, origine de l'eau),
- justification du choix de la dose de départ.

Résultats :

- tableaux des résultats par sexe et par dose pour chaque animal (à savoir les animaux présentant des signes d'intoxication, mortalité comprise; nature, gravité et durée des effets),
- date d'apparition des signes de toxicité, évolution dans le temps et réversibilité éventuelle,
- résultats de l'autopsie et le cas échéant de l'examen histopathologique, pour chaque animal.

Discussion des résultats

Conclusions

## 4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 423 de l'OCDE.

---

### Annexe 1

#### MODE OPÉRATOIRE

1. Comme indiqué au paragraphe 1.4.2.3, la dose de départ doit être la dose susceptible d'entraîner une mortalité chez au moins certains des animaux traités. Les informations pouvant servir à sélectionner cette dose de départ sont les suivantes :

- données relatives aux propriétés physico-chimiques,
- relation structure-activité,
- toutes les données résultant des autres essais de toxicité,
- usage prévu de la substance à tester.

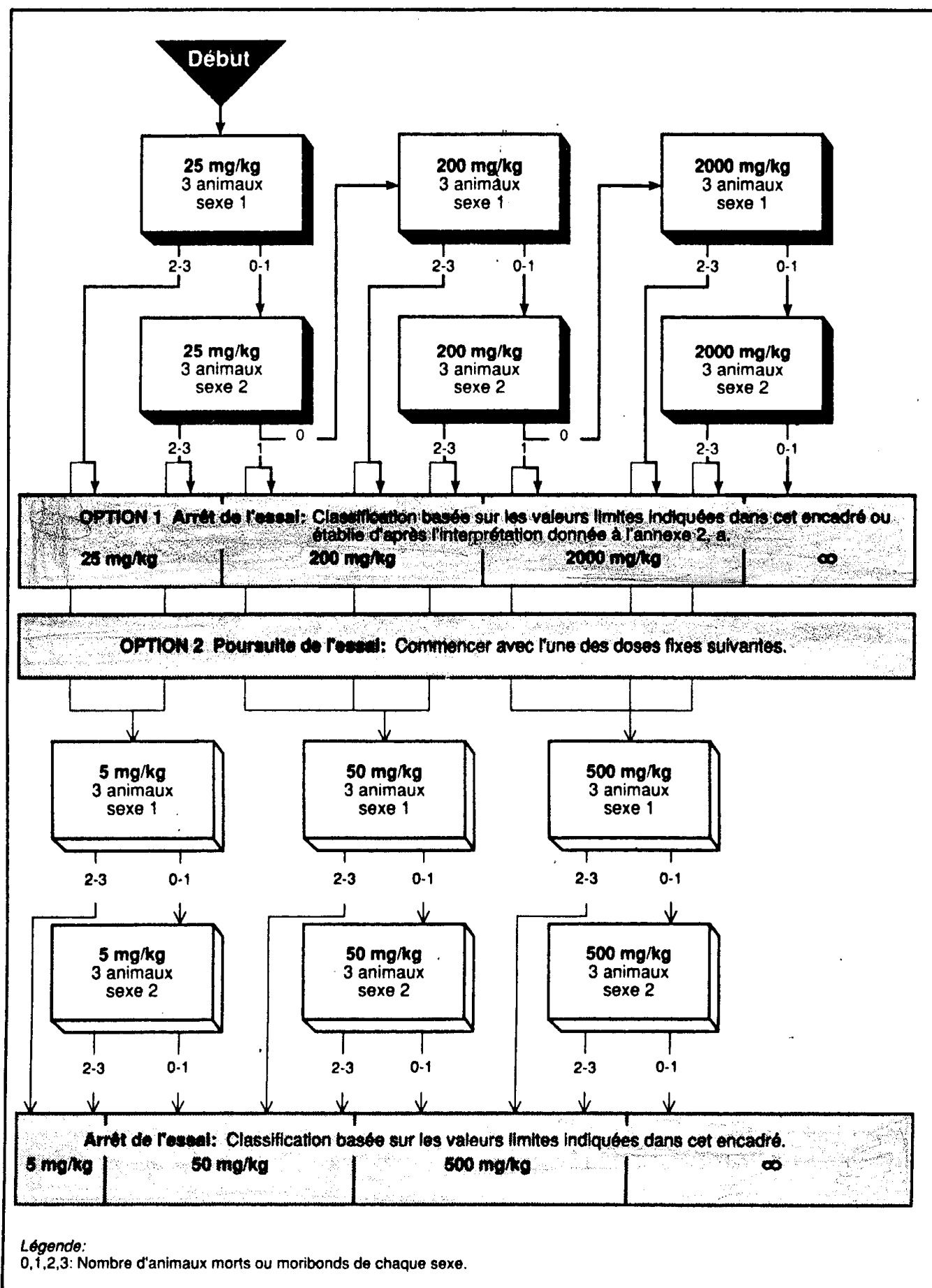
2. Pour chaque dose de départ, la procédure à suivre est indiquée par le programme d'essai correspondant figurant dans la présente annexe. En fonction du nombre d'animaux morts ou sacrifiés selon une méthode humaine, la procédure à suivre est indiquée par des flèches.

3. Lorsque l'administration d'une dose de départ de 25 ou de 200 mg/kg de poids corporel entraîne la mort d'un seul animal de l'autre sexe, l'essai n'a normalement pas à être poursuivi. Toutefois, si aucun signe de toxicité n'est observé sur les cinq autres animaux, il convient, au moment de l'autopsie, d'envisager la possibilité que le décès n'ait pas été causé par la substance. Dans ce cas, l'essai doit être poursuivi en utilisant la dose immédiatement supérieure.

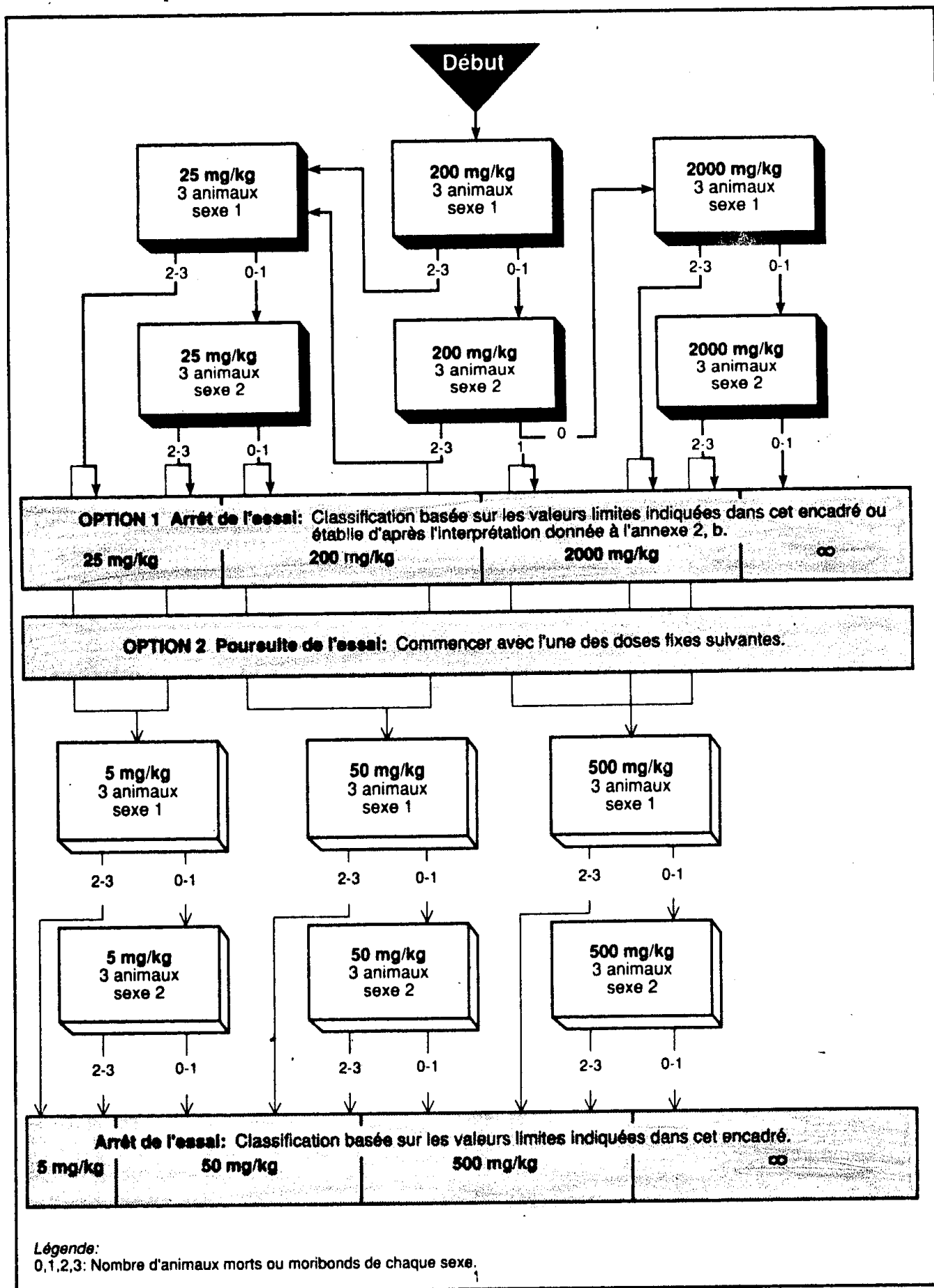
4. Si l'administration d'une dose de 2 000 mg/kg de poids corporel entraîne la mort d'un animal de chaque sexe, il est probable que la  $DL_{50}$  soit supérieure à 2 000 mg/kg p.c. Toutefois, dans la mesure où il s'agit d'un résultat limite, il convient d'observer attentivement la réaction des deux autres animaux de chaque sexe car l'apparition de signes nets et marqués d'intoxication chez ces animaux pourrait aboutir à une classification correspondant à une  $DL_{50}$  inférieure ou égale à 2 000 mg/kg p.c. ou justifier la poursuite de l'essai à cette même dose.

5. La procédure permet d'effectuer l'essai en utilisant trois doses fixes supplémentaires (option 2). Cette option peut être utilisée pour sélectionner une autre dose à un moment donné, ou pour poursuivre les essais une fois l'essai en question terminé (option 1). L'option 1 est indiquée par des flèches épaisses, l'option 2 par des flèches fines.

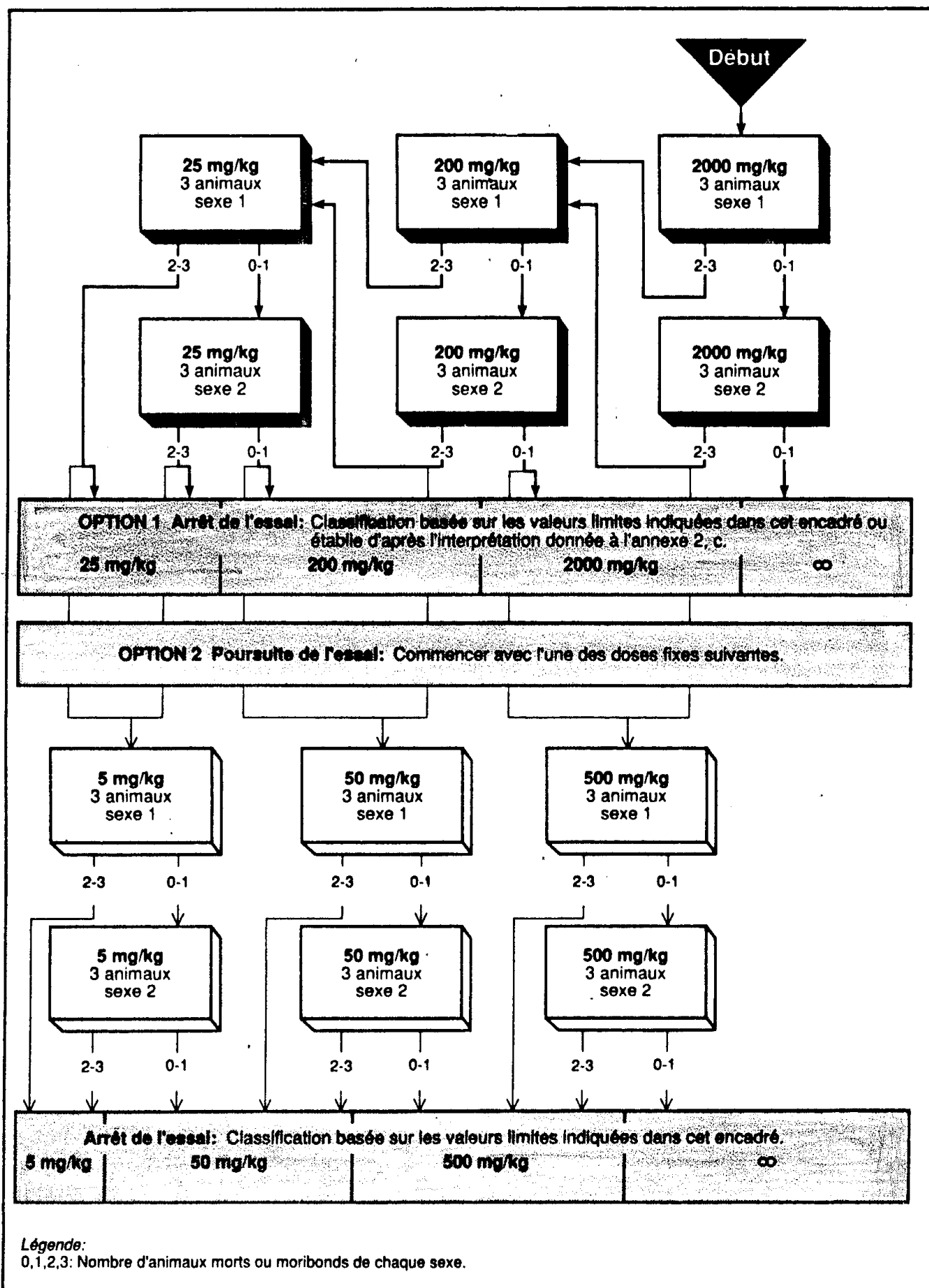
## a) Procédure d'essai pour une dose de départ de 25 mg/kg p.c.



## b) Procédure d'essai pour une dose de départ de 200 mg/kg p.c.



## c) Procédure d'essai pour une dose de départ de 2 000 mg/kg p.c.



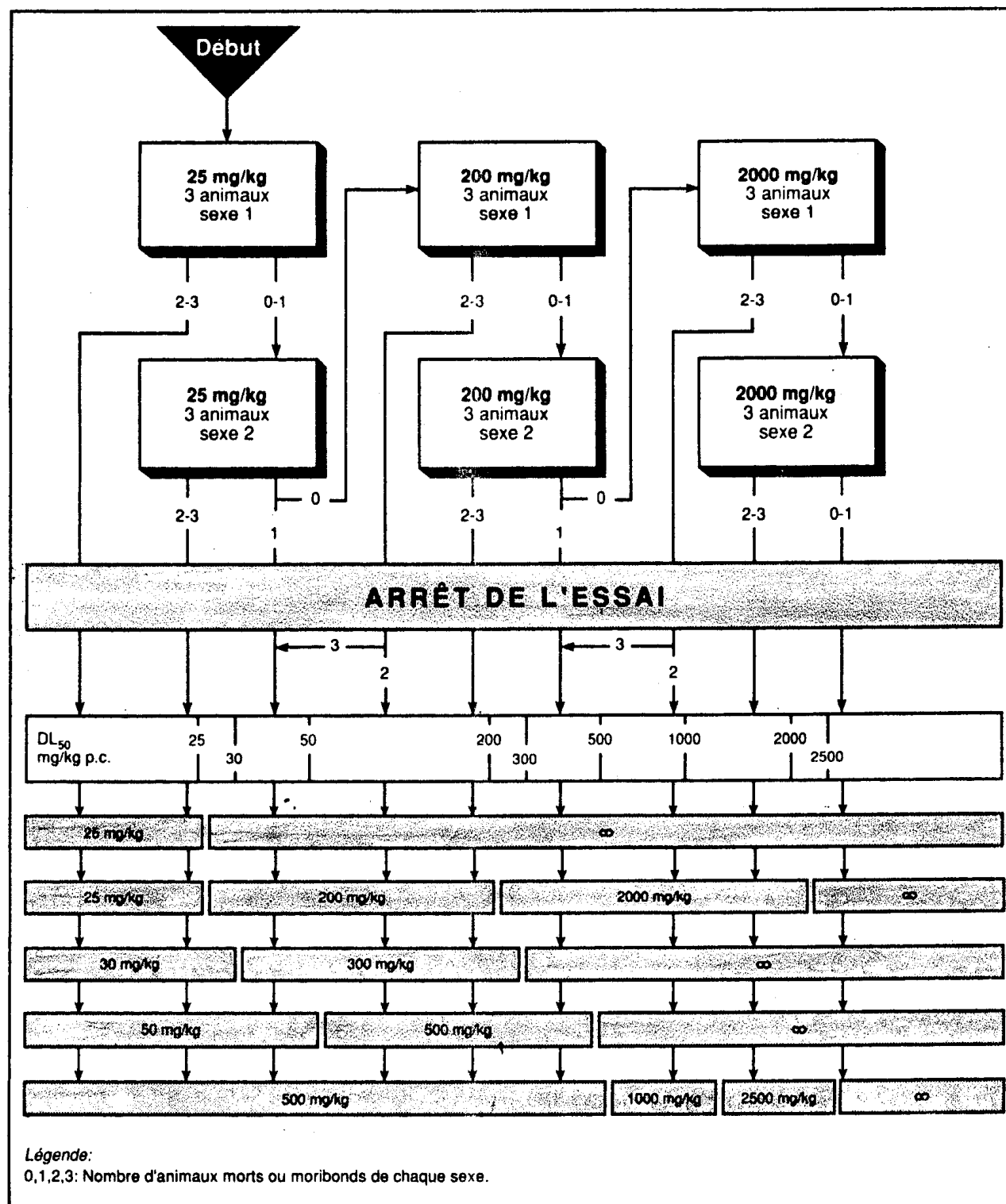
## ANNEXE 2

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'APRÈS L'ESSAI OPTION 1

Les encadrés gris figurant sous l'encadré «Arrêt de l'essai» dans les diagrammes de la présente annexe représentent les valeurs limites servant à la classification. Selon la procédure indiquée pour l'option 1, il faut suivre la flèche appropriée jusqu'à l'encadré gris pertinent, dans le bas du diagramme.

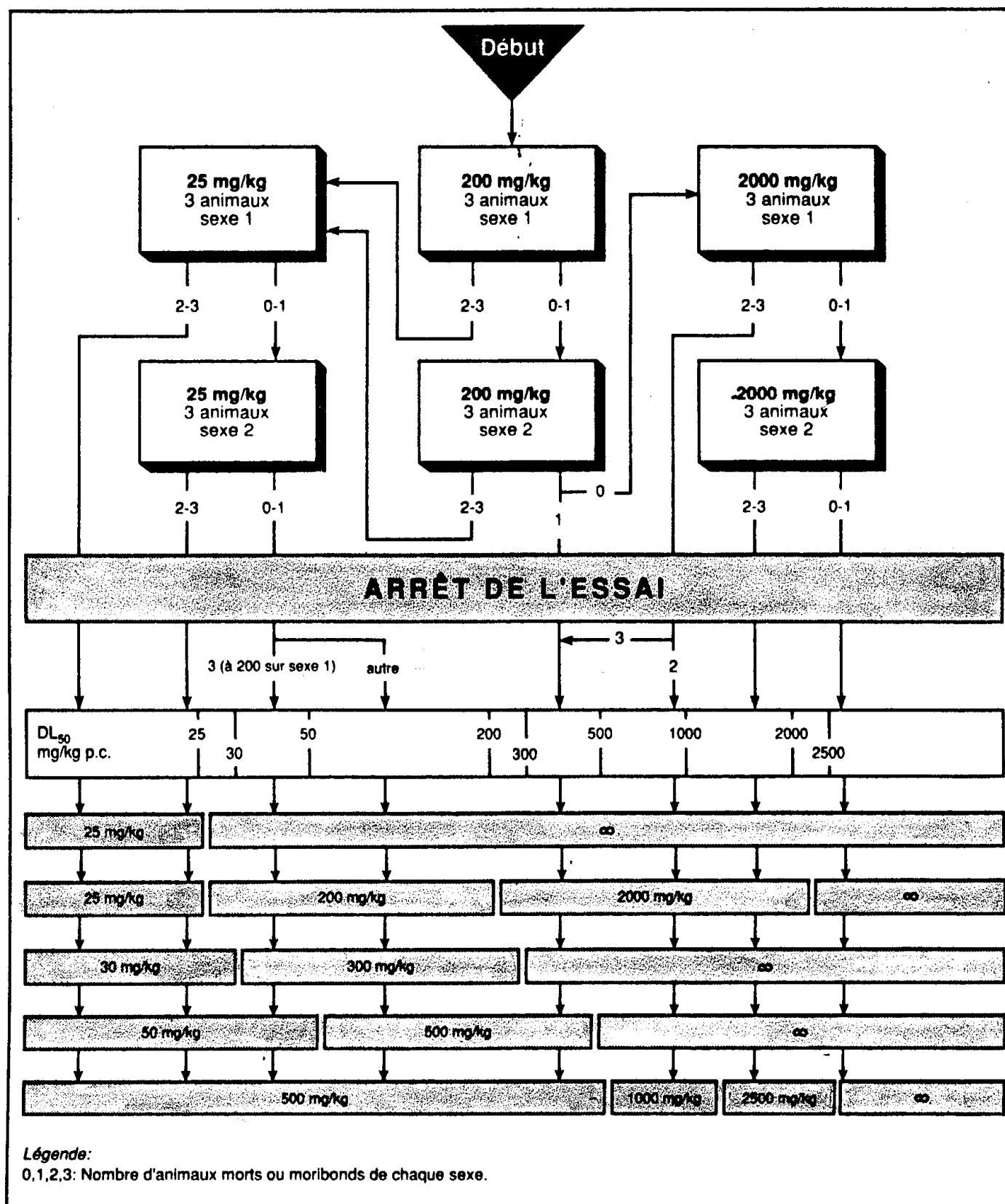
## a) Interprétation des résultats d'après l'essai option 1

Dose de départ: 25 mg/kg de poids corporel



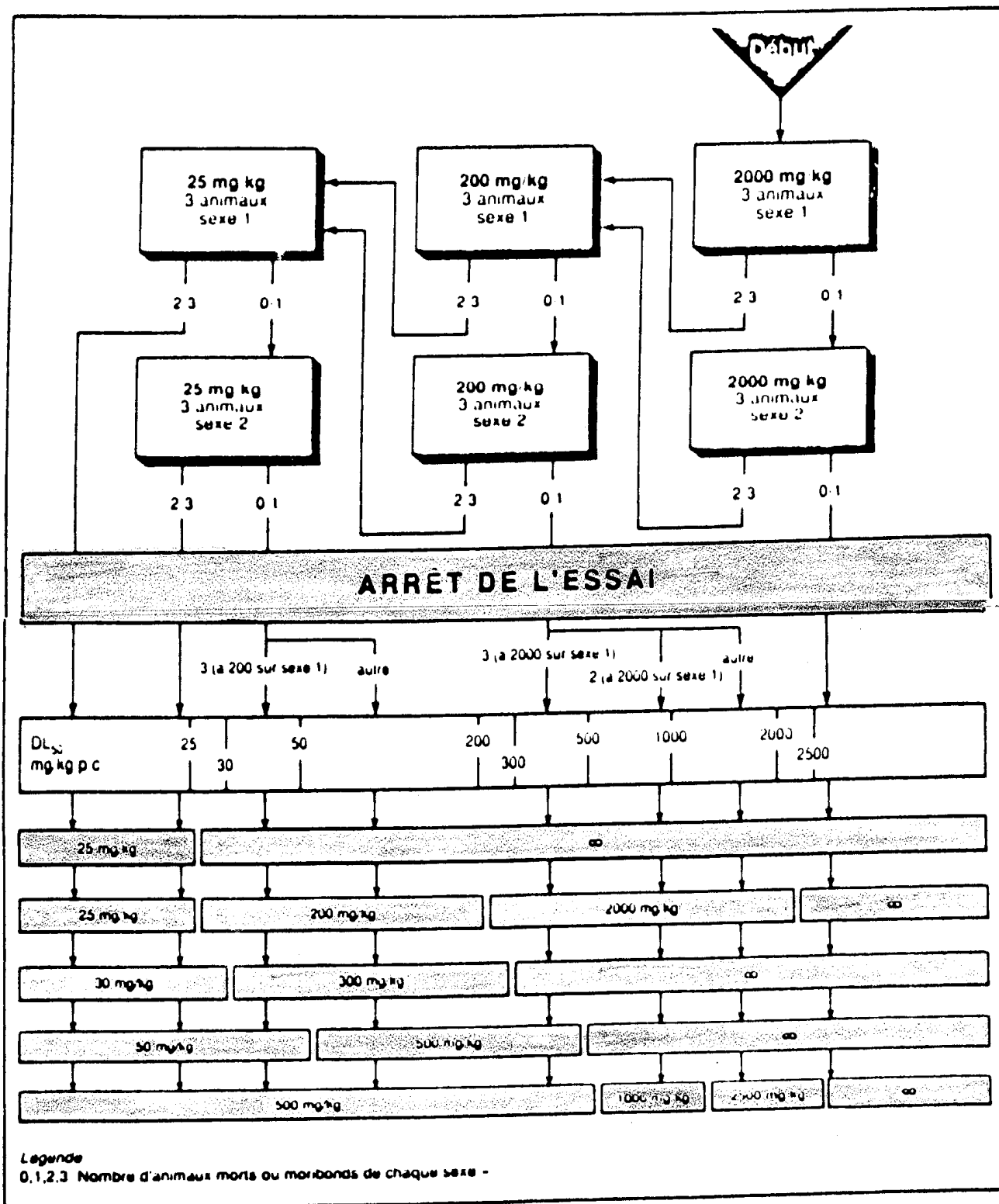
## b) Interprétation des résultats d'après l'essai option 1

Dose de départ: 200 mg/kg de poids corporel



c) Interprétation des résultats d'après l'essai option 1

Dose de départ: 2 000 mg/kg de poids corporel



Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS



## Annexe II C

## « B.6 SENSIBILISATION CUTANÉE

## 1. MÉTHODE

## 1.1. Introduction

Remarques :

La sensibilité des essais et leur capacité à détecter les substances susceptibles d'entraîner une sensibilisation cutanée chez l'homme sont des critères importants dans un système de classification de la toxicité établi à des fins de santé publique.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier de manière adéquate toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation cutanée pour l'homme et qui puisse être appliquée à toutes les substances.

Divers facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, y compris son pouvoir de pénétration cutanée, doivent être pris en considération lors du choix de l'essai.

Deux types d'essai utilisant des cobayes ont été développés : d'une part, les essais avec adjuvant dans lesquels l'état est potentialisé par la dissolution ou la mise en suspension dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF) de la substance à tester, et d'autre part les essais sans adjuvant.

Les essais avec adjuvant ont généralement un meilleur pouvoir prédictif du potentiel sensibilisant cutané de la substance testée avec plus de précision que les méthodes qui n'utilisent pas l'adjuvant complet de Freund. C'est la raison pour laquelle leur utilisation est préférable.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GPMT : Guinea Pig Maximisation Test) est un essai avec adjuvant très répandu. Bien qu'il existe plusieurs autres méthodes pour détecter le potentiel de sensibilisation cutanée, le GPMT est l'essai avec adjuvant de prédilection.

Les essais sans adjuvant (l'essai de Buehler étant préférable) sont considérés comme moins sensibles vis-à-vis de nombreuses classes de produits chimiques.

Dans certains cas, l'essai de Buehler qui consiste en une application topique, peut s'avérer préférable à l'essai de maximalisation qui nécessite une injection intradermique. L'utilisation de l'essai de Buehler doit être scientifiquement justifiée.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT) et l'essai de Buehler sont décrits dans cette méthode. D'autres méthodes peuvent être utilisées, à condition qu'elles soient correctement validées et que leur utilisation soit scientifiquement justifiée.

Si un résultat positif est obtenu dans un test de dépistage reconnu, une substance peut être considéré comme un sensibilisant potentiel et il peut ne pas être nécessaire de réaliser un essai complémentaire sur le cobaye. Cependant si un résultat négatif est obtenu dans un tel test de dépistage, un essai sur le cobaye doit être effectué en utilisant la procédure décrite dans la présente méthode d'essai.

Voir également introduction générale, partie B.

## 1.2. Définitions

La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée à une substance. Chez l'homme, la réaction peut se caractériser par un prurit, un érythème, un œdème, des vésicules, des bulles ou une association de ces manifestations. Dans les autres espèces, la réaction peut différer et prendre uniquement la forme d'un érythème ou d'un œdème.

Exposition d'induction : exposition expérimentale d'un sujet à une substance dans le but d'induire une hypersensibilité.

Période d'induction : période d'au moins une semaine consécutive à l'exposition d'induction, au cours de laquelle une hypersensibilité peut s'installer.

Exposition de déclenchement : exposition expérimentale, après période d'induction, d'un sujet préalablement exposé à la substance, dans le but de vérifier si le sujet présente une réaction d'hypersensibilité.

## 1.3. Substances de référence

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée doivent être vérifiées tous les six mois à l'aide de substances ayant des propriétés connues de sensibilisation cutanée faible à modérée.

Pour un essai conduit selon les règles, les substances faiblement ou moyennement sensibilisantes provoquent normalement une réaction d'au moins 30 % dans les méthodes avec adjuvant et 15 % dans les méthodes sans adjuvant.

Les substances suivantes seront de préférence utilisées :

Numéro CAS	Numéro EINECS	Dénomination EINECS	Dénomination usuelle
101-86-0	202-983-3	$\alpha$ -hexylcinnamaldéhyde	$\alpha$ -hexylcinnamaldéhyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazole-2-thiol (mercaptobenzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	nordcaïne

Dans certaines circonstances dûment justifiées, il est possible d'utiliser d'autres substances répondant aux critères ci-dessus.

#### 1.4. Principe de la méthode d'essai

Les animaux d'expérience sont dans un premier temps exposés à la substance à tester par une injection intradermique et/ou une application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire peut se produire, les animaux sont exposés à une dose de déclenchement. L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux sont alors comparées à celles de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu un placebo lors de l'induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

#### 1.5. Description des méthodes d'essai

Si l'élimination de la substance à tester s'avère nécessaire, ceci doit être fait en utilisant de l'eau ou un solvant approprié afin de ne pas modifier la réaction existante ou l'intégrité de l'épiderme.

##### 1.5.1. Essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT)

###### 1.5.1.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont tondu, rasés ou épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

###### 1.5.1.2. Conditions de l'essai

###### 1.5.1.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

###### 1.5.1.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 10 animaux et le lot témoin, au moins 5. Si le lot traité comprend moins de 20 animaux et le lot témoin moins de 10, et qu'il n'est pas possible de conclure que la substance à tester est un agent sensibilisant. Dans ce cas, il est fortement recommandé d'utiliser d'autres animaux afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux d'essai et 10 animaux témoins.

###### 1.5.1.2.3. Doses

La concentration de substance utilisée pour chaque exposition d'induction doit être bien tolérée par l'organisme des animaux et doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux. À cet effet, il convient d'utiliser des animaux traités par l'adjuvant complet de Freund.

###### 1.5.1.3. Mode opératoire

###### 1.5.1.3.1. Induction

Jour 0 - lot traité

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont pratiquées dans la région scapulaire préalablement débarrassée de ses poils, de part et d'autre de la ligne médiane.

Injection 1 : mélange 1 :1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2 : la substance à tester dans un véhicule adéquat, à la concentration sélectionnée

Injection 3 : la substance à tester à la concentration voulue, mélangée dans un rapport 1 :1 (v/v) à de l'adjuvant complet de Freund ou du sérum physiologique.

Pour l'injection 3, les substances hydrosolubles sont dissoutes dans la phase aqueuse avant d'être mélangées avec l'adjuvant complet de Freund. Les substances liposolubles ou insolubles sont d'abord mises en suspension dans l'adjuvant complet de Freund, puis mises en phase aqueuse. La concentration finale de la substance à tester doit être égale à celle utilisée pour l'injection 2.

Les injections 1 et 2 sont pratiquées à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 est effectuée vers la partie caudale de la zone d'essai.

Jour 0 - lot témoin

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont réalisées aux mêmes endroits que chez les animaux traités.

Injection 1 : mélange 1 :1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2 : le véhicule non dilué

Injection 3 : formulation à 50 % du véhicule dans un mélange 1 :1 d'adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique.

5ème - 7ème jour - lot traité et lot témoin

Environ 24 heures avant l'application topique d'induction et si la substance ne provoque pas d'irritation cutanée, la zone d'essai rasée et/ou tondue est badigeonnée avec 0,5 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans de la vaseline, afin de créer une irritation locale.

6ème - 8ème jour - lot traité

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Un papier filtre (2 x 4 cm) imprégné de la substance dans le véhicule approprié est appliqué sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau à l'aide d'un pansement occlusif pendant 48 heures. Le choix du véhicule doit être justifié. Les substances solides sont réduites en poudre fine et incorporées dans un véhicule approprié; les substances liquides peuvent éventuellement être appliquées directement.

6ème - 8ème jour - lot témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué comme indiqué précédemment sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

###### 1.5.1.3.2. Déclenchement

20ème - 22ème jour - lot traité et lot témoin

Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Un patch ou une cupule chargés de la substance à tester est appliqué sur un des flancs des animaux et, s'il y a lieu, un patch ou une cupule imprégnés uniquement du véhicule est appliqué sur l'autre flanc. Les pastilles sont maintenues en contact avec la peau pendant 24 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

#### 1.5.1.3.3. Observation et cotation : lot traité et lot témoin

- Environ 21 heures après le retrait de la pastille, la zone étudiée est nettoyée et rasée et/ou tondue et épilée si nécessaire;

- 3 heures plus tard environ (à peu près 48 heures après le début de l'application de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;

- environ 24 heures après cette observation, on procède à une seconde observation (72 heures) et à une nouvelle cotation.

Il est recommandé de procéder à une lecture en aveugle chez les animaux traités et les animaux témoins.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement (c.-à-d. redéclenchement), si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement, doivent être observées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

#### 1.5.2. Essai de Buehler

##### 1.5.2.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont coupés, rasés ou éventuellement épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

##### 1.5.2.2. Conditions de l'essai

###### 1.5.2.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

###### 1.5.2.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 20 animaux et le lot témoin, au moins 10.

##### 1.5.2.2.3. Doses

Pour chaque exposition d'induction, la concentration de substance à utiliser est la concentration maximale entraînant une irritation modérée mais non excessive. Pour l'exposition de déclenchement, la concentration à utiliser est la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux.

Pour les substances hydrosolubles, il convient d'utiliser comme véhicule de l'eau ou une solution diluée non irritante de surfactant. Pour les autres substances, il est préférable d'utiliser un mélange d'éthanol à 80 % dans de l'eau pour l'induction, et de l'acétone pour le déclenchement.

##### 1.5.2.3. Mode opératoire

###### 1.5.2.3.1. Induction

###### Jour 0 - lot traité

Un des flancs des animaux est rasé. La compresse servant à réaliser le test est imprégnée de la substance à tester incorporée dans un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; les substances liquides peuvent au besoin être appliquées directement). La compresse est appliquée sur la zone d'essai et maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié.

Le système doit être occlusif. Un tampon de ouate rond ou carré de 4 à 6 cm<sup>2</sup> convient. Il est préférable d'utiliser un dispositif de contention approprié pour garantir l'occlusion. Si l'on utilise des bandages, des expositions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires.

###### Jour 0 - lot témoin

Un des flancs des animaux est rasé. Le véhicule seul est appliqué de la façon décrite pour les animaux traités. La compresse servant à réaliser le test est maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié. S'il peut être prouvé qu'il n'est pas nécessaire de simuler le traitement sur le lot témoin, cette étape peut être omise, un contrôle ne recevant rien peut être utilisé.

###### 6ème - 8ème jour et 13ème - 15ème jour - lot traité et lot témoin

La même application que celle décrite au jour 0 est réalisée sur la même zone (débarrassée de ses poils si nécessaire) du même flanc au 6ème - 8ème jour, puis à nouveau au 13ème - 15ème jour.

##### 1.5.2.3.2. Déclenchement

###### 27ème - 29ème jour - lot traité et lot témoin

Le flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin est rasé. Une compresse occlusive ou une cupule contenant la quantité appropriée de la substance à tester, à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation, est appliquée sur la partie postérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin.

S'il y a lieu, on appliquera également une compresse occlusive ou une cupule ne contenant que le véhicule sur la partie antérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin. Les compresses ou cupules sont maintenues en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 6 heures.

##### 1.5.2.3.3. Observations et cotation

- Environ 21 heures après le retrait de la compresse, la zone d'essai est débarrassée de ses poils;

- environ trois heures plus tard (à peu près 30 heures après le début de l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;

- environ 24 heures après cette observation (soit environ 54 heures après l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est à nouveau observée et cotée.

Il est recommandé d'effectuer une lecture en aveugle de la réaction dans le lot traité et le lot témoin.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement, si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement (c.-à-d. de redéclenchement), doivent être consignées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

## 2. RÉSULTATS (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)

Les résultats sont récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal, la réaction cutanée lors de chaque observation.

## 3. COMPTE RENDU (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)

Lorsqu'un test de dépistage (p. ex. essai local sur ganglions lymphatiques (LLNA), essai de gonflement de l'oreille de souris (MEST)), est effectué préalablement à l'essai sur le cobaye, il convient d'en fournir la description ou la référence, ainsi que les détails du mode opératoire et les résultats obtenus avec la substance à tester et les substances de référence.

Procès-verbal d'essai (GMPT et essai de Buehler)

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants :

Animaux d'expérience :

- souche de cobayes utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales :

- technique de préparation du site d'application,
- détails sur les matériaux utilisés pour l'application et la technique d'application,
- résultats de l'étude pilote et conclusions concernant les concentrations d'induction et de déclenchement à utiliser dans l'essai,
- détails concernant la préparation, l'application et l'élimination de la substance à tester,
- justification du choix du véhicule,
- concentrations du véhicule et de la substance à tester utilisées pour les expositions d'induction et de déclenchement, et quantité totale de substance appliquée pour l'induction et le déclenchement.

Résultats :

- résumé des résultats du dernier contrôle de sensibilité et de fiabilité (voir 1.3), y compris informations sur la substance, la concentration et le véhicule utilisés,
- toute observation effectuée sur chaque animal, cotations comprises,
- description de la nature et de la gravité des effets observés,
- toute observation histopathologique.

Discussion des résultats

Conclusions

## 4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 406 de l'OCDE.

Appendice

TABLEAU :

échelle de Magnusson et Kligman pour la cotation des réactions cutanées à une exposition de déclenchement

0 = pas de modification apparente

1 = érythème discret ou localisé

2 = érythème modéré et confluent

3 = érythème intense avec gonflement »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS

Annexe II D

## « B.7 TOXICITÉ (ORALE) PAR ADMINISTRATION RÉPÉTÉE (28 JOURS)

### 1. MÉTHODE

#### 1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B.

#### 1.2. Définitions

Voir introduction générale, partie B.

#### 1.3. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée quotidiennement, par voie orale, à doses croissantes, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par lot pendant 28 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement chaque jour pour déceler les éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'expérience ainsi que ceux qui survivent jusqu'à la fin de l'essai sont autopsiés.

Cette méthode insiste davantage sur les effets neurologiques; les observations cliniques doivent être effectuées avec grand soin pour obtenir le maximum d'informations possible. La méthode vise à identifier les produits chimiques ayant un potentiel neurotoxique qui pourrait nécessiter des études plus approfondies. En outre, cette méthode peut fournir des indications sur les effets immunologiques et sur la toxicité de la substance pour les organes de la reproduction.

#### 1.4. Description de la méthode d'essai

##### 1.4.1. Préparation

De jeunes animaux adultes, sains, sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Les cages seront disposées de façon à minimiser les éventuels effets dus à l'emplacement des cages. Les animaux sont identifiés individuellement et maintenus dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, pour leur permettre de s'acclimater aux conditions régnant dans le laboratoire.

La substance à tester est administrée par gavage ou dans l'alimentation ou l'eau de boisson. La méthode d'administration orale dépend du but de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance.

Si nécessaire, la substance à tester est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Chaque fois que possible, on utilisera plutôt une solution/suspension aqueuse, ou sinon une solution/émulsion huileuse (par exemple huile de maïs) et en dernier lieu d'autres véhicules. Si le véhicule utilisé n'est pas de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues. Il convient de déterminer la stabilité de la substance à tester dans le véhicule.

##### 1.4.2. Conditions de l'essai

###### 1.4.2.1. Animaux d'expérience

Les expériences sont de préférence effectuées sur le rat, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. Les animaux adultes jeunes et sains sont issus de souches couramment utilisées en laboratoires. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration de la substance doit débuter le plus tôt possible après le sevrage, et dans tous les cas, avant que les animaux aient atteint l'âge de neuf semaines.

Au début de l'étude, l'écart de poids entre les animaux doit être minime et ne doit pas dépasser - 20 % du poids moyen de chaque sexe.

Lorsqu'une étude par administration orale répétée est effectuée préalablement à une étude à long terme, il est préférable d'utiliser des animaux de même souche et de même origine pour les deux études.

###### 1.4.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (5 femelles et 5 mâles) sont utilisés pour chaque dose. Si le protocole expérimental prévoit des sacrifices en cours d'étude, le nombre d'animaux doit être augmenté du nombre de sacrifices prévus.

En outre, un lot satellite de 10 animaux (cinq de chaque sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et placé en observation pendant 14 jours après l'arrêt du traitement pour étudier la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques. Un lot satellite de 10 animaux témoins est également utilisé.

###### 1.4.2.3. Niveau des doses

On utilise en général au moins trois lots d'essai et un lot témoin. A l'exception de la substance à tester, les animaux du lot témoin reçoivent le même traitement que les animaux des lots traités. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance à tester, le volume maximal de ce véhicule sera administré au lot témoin.

S'il ressort de l'évaluation d'autres données que l'administration d'une dose de 1 000 mg/kg./j ne devrait pas entraîner d'effets, il est possible d'effectuer un essai de limite. En l'absence de données pertinentes, on peut procéder à une étude exploratoire pour aider à déterminer les doses à utiliser.

Les doses doivent être choisies en tenant compte de toutes les données disponibles concernant la toxicité et les aspects toxico-cinétiques de la substance à tester ou des substances de structure analogue. La dose la plus élevée doit produire des effets toxiques sans entraîner la mort ni des souffrances intenses. Une série de doses décroissantes est ensuite choisie, dans le but de mettre en évidence une relation entre la réaction et la dose administrée et d'objectiver une absence d'effets adverses à la dose la plus faible (dose sans effet adverse observé). L'écart optimal entre deux doses est souvent un facteur 2 à 4; il est préférable de prévoir une quatrième dose plutôt que d'avoir un écart excessif entre deux doses (plus qu'un facteur 10).

Pour les substances qui sont administrées dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson, il est important de vérifier que les quantités de substance d'essai administrées n'interfèrent pas sur la nutrition normale et l'équilibre hydrique. Si la substance est administrée dans l'alimentation, on peut utiliser une concentration alimentaire constante (ppm) ou une dose constante par rapport au poids de l'animal; la solution choisie doit être précisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à heure fixe et si nécessaire ajustée pour rester constante par rapport au poids de l'animal.

Lorsqu'une étude par administration orale répétée est effectuée préalablement à une étude à long terme, le régime alimentaire doit être identique dans les deux études.

###### 1.4.2.4. Essai limite

Lorsqu'un essai réalisé selon les méthodes décrites dans la présente étude, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg poids corporel/jour, ou en cas d'administration dans l'alimentation ou l'eau de boisson, à une concentration équivalente (en fonction du poids corporel), ne produit pas d'effets toxiques observables et que les données relatives à des substances de structure apparentée ne laissent pas présumer une toxicité, il peut s'avérer inutile d'effectuer une étude complète sur trois doses. Dans ce cas, un essai limite se justifie, sauf si l'exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

###### 1.4.2.5. Période d'observation

La période d'observation dure 28 jours. Les animaux des lots satellites prévus pour des observations complémentaires seront maintenus en observation, sans aucun traitement, pendant 14 jours supplémentaires au moins, afin de détecter l'apparition retardée, la persistance ou la réversibilité des effets toxiques.

##### 1.4.3. Mode opératoire

La substance à tester est administrée aux animaux sept jours sur sept pendant 28 jours. Si la substance n'est administrée qu'à raison de cinq jours par semaine, ce choix doit être justifié. En cas d'administration par gavage, la dose doit être administrée en une fois à l'aide d'une sonde œsophagienne ou d'une canule à intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, mais peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel lorsqu'il s'agit de solutions aqueuses. Sauf en ce qui concerne les substances irritantes ou corrosives pour lesquelles une augmentation de la concentration entraînerait des effets exacerbés, la variabilité des volumes d'essai doit être minimisée par un ajustement des concentrations, afin que le volume reste constant quelle que soit la dose.

#### 1.4.3.1. Observation générale

L'observation clinique générale doit être effectuée au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en fonction de la période post-administration où les effets sont les plus marqués. L'état de santé des animaux doit être consigné. Au moins deux fois par jour, tous les animaux sont examinés pour déterminer la morbidité et la mortalité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intenses sont immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Tous les animaux sont soumis à une observation clinique détaillée une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même sujet) et au moins une fois par semaine par la suite. Ces observations doivent être effectuées sur les animaux sortis de leur cage et placés dans une enceinte standard, et doivent de préférence avoir lieu toujours au même moment. Les observations doivent être soigneusement consignées, de préférence à l'aide de systèmes de notation explicitement définis par le laboratoire d'essai. Il convient de veiller à ce que les conditions expérimentales varient le moins possible, il est souhaitable que les personnes qui effectuent les observations ne soient pas informées du traitement administré. Les observations doivent porter, entre autres, sur les modifications de la peau, du poil, des yeux, des muqueuses, des sécrétions et excréments et de l'activité autonome (par exemple larmoiement, hérissément du poil, respiration inhabituelle). Il convient également de noter tout changement de comportement, de posture ou de réaction à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, animaux qui tournent en rond de façon répétitive) ainsi que tout comportement bizarre (auto-mutilation, marche à reculons).

Au cours de la quatrième semaine d'exposition, la réactivité aux différents stimuli sensoriels (auditifs, visuels et proprioceptifs), ainsi que la force de préhension et l'activité motrice sont évaluées. Les méthodes utilisables à cet effet sont détaillées dans les publications de référence (voir introduction générale, partie B).

Les observations fonctionnelles de la quatrième semaine d'exposition peuvent être omises si l'étude est effectuée préalablement à une étude subchronique (sur 90 jours). Dans ce cas, les observations fonctionnelles doivent faire partie de l'étude complémentaire. En revanche, l'existence de données résultant des observations fonctionnelles effectuées lors de l'étude préliminaire par administration répétée peut faciliter le choix des doses pour l'étude subchronique complémentaire.

Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent également être omises pour les lots qui montrent des signes de toxicité tels que les examens fonctionnels perdraient de leur valeur.

#### 1.4.3.2. Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. La consommation d'aliments et d'eau doit être mesurée au minimum une fois par semaine. Si la substance est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit également être mesurée une fois par semaine au minimum.

#### 1.4.3.3. Hématologie

Les examens hématologiques suivants doivent être réalisés à la fin de la période d'essai : hémocrite, concentration en hémoglobine, numération des hématies et des leucocytes et formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps/potential de coagulation.

Les échantillons de sang doivent être prélevés en un point déterminé, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux, et conservés dans des conditions appropriées.

#### 1.4.3.4. Biochimie clinique

Des analyses biochimiques cliniques visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus et en particulier sur le foie et les reins doivent être effectuées sur les échantillons de sang prélevés sur tous les animaux juste avant ou pendant le sacrifice (à l'exception des animaux retrouvés moribonds ou sacrifiés en cours d'essai). Il est préférable que les animaux soient à jeun depuis la veille (1). Ces déterminations effectuées dans le sérum ou le plasma concernent notamment le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, le créatinine, les protéines totales et l'albumine, et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine, aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma-glutamyl transpeptidase et la sorbitol-deshydrogénase). La détermination d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) ainsi que des acides biliaires peut dans certains cas fournir des informations utiles.

Éventuellement, des analyses d'urine peuvent être effectuées au cours de la dernière semaine de l'étude, comprenant un recueil du volume urinaire en un temps donné : aspect, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, de sang ou de cellules sanguines.

En outre, des études portant sur les marqueurs sériques des lésions tissulaires doivent être considérées. Les autres déterminations éventuellement nécessaires lorsque les propriétés de la substance à tester sont susceptibles de modifier les profils métaboliques concernant le calcium, le phosphate, les triglycérides à jeun, les hormones spécifiques, le méthémoglobine et la cholinestérase. Ces analyses devront être effectuées systématiquement pour les substances appartenant à certaines classes et au cas par cas pour les autres.

Dans l'ensemble, la démarche adoptée doit être souple et pouvoir être adaptée en fonction de l'espèce utilisée et des effets observés et/ou prévisibles de la substance considérée.

Si les données historiques de base recueillies antérieurement sont insuffisantes, les paramètres hématologiques et biochimiques devront être déterminés avant le début de l'expérience.

#### 1.4.3.5. Autopsie

Tous les animaux de l'étude doivent faire l'objet d'une autopsie détaillée comportant un examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épидидymes, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux seront débarrassés de tous les tissus adhérents et pesés le plus rapidement possible pour éviter le dessèchement.

Les tissus ci-après seront conservés dans le milieu de fixation le plus approprié en fonction du type de tissu et des examens histopathologiques prévus : tout tissu présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (régions représentatives : cerveau, cervelet et protubérance annulaire), la moelle épinière, l'estomac, le colon et l'intestin grêle (y compris plaques de Peyer), le foie, les reins, les surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la thyroïde, la trachée et les poumons (conservés par insufflation d'un fixateur et immersion), les gonades, les organes génitaux annexes (par exemple : utérus, prostate), la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion sur le trajet de la voie d'administration et un autre à distance pour couvrir les effets systémiques), nerfs périphériques (sciatique ou tibial) de préférence très près du muscle, et une coupe de moelle osseuse (ou lame fraîchement montée de moelle recueillie par aspiration). En fonction des observations cliniques et des autres résultats, il peut s'avérer nécessaire d'examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme organes cibles potentiels du fait des propriétés de la substance doivent également être conservés.

#### 1.4.3.6. Examen histopathologique

Pour tous les animaux du lot témoin et du lot traité à la dose la plus élevée, il est pratiqué un examen histopathologique complet des organes et tissus conservés. Cet examen devra être pratiqué pour tous les lots exposés à des doses inférieures si des modifications induites par la substance à tester sont observées chez les animaux du lot traité à la dose la plus élevée.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Lorsqu'un lot satellite est utilisé, un examen histopathologique doit être pratiqué sur les organes et tissus sur lesquels des effets ont été observés dans les lots traités.

#### 2. RESULTATS

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou sacrifiés pour des raisons humanitaires, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité ainsi qu'une description de ces signes, le moment d'apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, le type de lésion et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion.

Si possible, les résultats numériques seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée et reconnue. La méthode statistique doit être choisie lors de la conception de l'étude.

#### 3. COMPTE RENDU

Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les informations suivantes :

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée,
- nombre d'animaux, âge et sexe,
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai, à intervalles d'une semaine par la suite et à la fin de l'essai.

Conditions expérimentales :

- justification du choix du véhicule si autre que de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- détails concernant la formulation/préparation de la substance, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- détails concernant l'administration de la substance,
- le cas échéant, conversion de la concentration de la substance dans la ration alimentaire/l'eau de boisson (ppm) en dose effective (mg/kg p.c./jour),
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau.

Résultats :

- poids corporel/modifications du poids corporel,
- consommation d'aliments et, le cas échéant, consommation d'eau,
- réponse toxique par sexe et par dose, signes de toxicité compris,
- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- évaluation de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice,
- tests hématologiques et valeurs de référence applicables,
- tests de biochimie clinique et valeurs de référence applicables,
- poids corporel au moment du sacrifice et poids des organes,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats de l'examen histopathologique,
- données relatives à l'absorption si disponibles,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusions

#### 4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 407 de l'OCDE. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS

—  
Note

(1) Pour un certain nombre de déterminations dans le sérum et le plasma, et principalement pour celle du glucose, il est préférable que les animaux soient à jeun depuis la veille. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer les effets les plus subtils et de rendre l'interprétation plus difficile. En revanche, le jeûne peut modifier le métabolisme général des animaux et, en particulier dans les études d'alimentation, perturber l'exposition quotidienne à la substance à tester. Si les prélèvements sont réalisés à jeun, les déterminations doivent être effectuées après les observations fonctionnelles de la quatrième semaine.

## Annexe II E

## « B.37 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË

## 1. MÉTHODE

## 1.1. Introduction

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'essais in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Voir introduction générale, partie B.

## 1.2. Définitions

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides phosphorothioiques, phosphonothioiques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase - NTE) dans les tissus nerveux.

## 1.3. Substances de référence

Une substance de référence peut être testée sur un lot témoin positif, afin de démontrer que, dans les conditions de l'essai, la réaction de l'espèce testée n'est pas modifiée de façon significative.

Le tri-o-tolyl phosphate est un exemple de produit neurotoxique couramment utilisé (no CAS 78-30-8, no EINECS 201-103-5, nomenclature CAS : acide phosphorique, tris(2-méthylphényl)ester); il est également connu sous le nom de tris-o-crésylphosphate.

## 1.4. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée oralement, en une prise unique, à des poules domestiques qui ont été protégées, le cas échéant, contre des effets cholinergiques aigus. Les animaux sont observés pendant 21 jours pour détecter des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après administration. 21 jours après l'exposition, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur des tissus nerveux choisis.

## 1.5. Description de la méthode d'essai

## 1.5.1. Préparation

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard en lots d'expérience et lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se mouvoir librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester est généralement administrée oralement, par gavage ou dans des capsules de gélatine, ou par une méthode comparable. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

## 1.5.2. Conditions de l'essai

## 1.5.2.1. Animaux d'expérience

L'espèce recommandée est la poule pondeuse domestique adulte jeune âgée de 8-12 mois (*Gallus gallus domesticus*). Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se mouvoir librement.

## 1.5.2.2. Nombre et sexe

Outre le lot d'expérience, il faut prévoir un lot témoin recevant le véhicule seul et un lot témoin positif. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les déterminations biochimiques (trois à chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation de 21 jours.

Le lot témoin positif peut être réalisé en parallèle ou provenir d'expériences antérieures récentes. Il doit se composer d'au moins six poules traitées par un produit neurotoxique connu à effet retardé; trois poules seront réservées aux examens biochimiques et trois à la recherche de signes pathologiques. La mise à jour périodique des données historiques recueillies antérieurement est recommandée. De nouveaux lots positifs devront être réalisés si une des conditions essentielles de l'expérience (par exemple souches, alimentation, hébergement) a été modifiée par le laboratoire chargé de l'essai.

## 1.5.2.3. Niveau de doses

Il convient d'effectuer une étude préliminaire sur un nombre approprié de poules réparties dans des lots traités à différentes doses, afin de déterminer la dose à utiliser pour l'étude principale. Un certain taux de mortalité est inévitable dans cette étude préliminaire. Toutefois, pour éviter la mort consécutive à des effets cholinergiques aigus, il est possible d'utiliser de l'atropine ou un autre agent protecteur ne perturbant pas la réaction neurotoxique différée. Diverses méthodes d'essai peuvent être utilisées pour évaluer la dose non létale maximale d'une substance (voir méthode B.1bis). Les données recueillies antérieurement sur les poules ou d'autres informations toxicologiques peuvent également être utiles pour déterminer la dose.



La dose utilisée dans l'étude principale doit être aussi élevée que possible, compte tenu des résultats de l'étude préliminaire et de la limite supérieure de 2 000 mg/kg poids corporel. Quel que soit le taux de mortalité, il doit subsister un nombre suffisant d'animaux pour effectuer les analyses biochimiques (six) et l'examen histologique (six) au 21ème jour. Il convient d'utiliser de l'atropine ou un autre agent qui ne perturbe pas les réactions neurotoxiques différées, afin d'éviter la mort par effets cholinergiques aigus.

#### 1.5.2.4. Essai limite

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 2 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure voisine ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

#### 1.5.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre sur 21 jours.

#### 1.5.3. Mode opératoire

Après administration d'un agent protecteur pour éviter que des effets cholinergiques aigus n'entraînent la mort, la substance à tester est administrée en une prise unique.

##### 1.5.3.1. Observation générale

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées soigneusement plusieurs fois au cours des deux premiers jours, puis au moins une fois par jour, pendant 21 jours ou jusqu'à la date prévue du sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être notés, ainsi que la date d'apparition des troubles du comportement, leur type, leur gravité et leur durée. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être notée. Au moins deux fois par semaine, les poules destinées à la recherche des signes pathologiques doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles par exemple, afin de faciliter l'observation de faibles manifestations de toxicité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

##### 1.5.3.2. Poids corporel

Toutes les poules sont pesées juste avant l'administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

##### 1.5.3.3. Biochimie

Six poules choisies au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins négatifs, ainsi que trois poules prélevées dans le lot témoin positif (si l'essai est réalisé en parallèle sur ce dernier) sont sacrifiées quelques jours après administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies. Il peut en outre s'avérer utile d'analyser l'inhibition de cette estérase sur du nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées après 24 heures et trois autres après 48 heures, tandis que les trois poules du lot témoin positif sont sacrifiées après 24 heures. Si l'observation des signes cliniques d'intoxication (souvent estimés par le moment d'apparition des effets cholinergiques) indique que la substance toxique est éliminée très lentement, il peut s'avérer préférable de prélever les tissus sur trois poules à deux autres temps compris entre 24 heures et au plus tard 72 heures après administration.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur des échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

##### 1.5.3.4. Autopsie

L'autopsie de tous les animaux (sacrifices prévus ou exigés par l'état de l'animal) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

##### 1.5.3.5. Examen histopathologique

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région lombo-sacrée. Des coupes devront également être réalisées dans la partie distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles gastrocnémiens, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones.

## 2. RÉSULTATS

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents points d'évaluation retenus (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est normalement pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être présentés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou troubles, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou trouble aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes statistiques appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

## 3. COMPTE RENDU

### Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants :

Animaux d'expérience :

- souche utilisée,
- nombre d'animaux et âge,

- origine, conditions d'hébergement, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'expérience.

Conditions expérimentales :

- détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,
- justification du choix du véhicule,
- détails concernant l'administration de la substance à tester,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,
- identité de l'agent protecteur éventuel et détails concernant son administration.

Résultats :

- données relatives au poids corporel,
- données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,
- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

#### 4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 418 de l'OCDE.

### B.38 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS

#### 1. MÉTHODE

##### 1.1. Introduction

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage *in vitro* peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'études *in vitro* ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Cet essai de neurotoxicité retardée sur 28 jours fournit des informations sur d'éventuels dangers pour la santé pouvant découler d'expositions répétées au cours d'une période déterminée. Il donnera des informations sur la relation dose-effet et pourra fournir une estimation du niveau de dose sans effet néfaste observé, pouvant être utile à l'établissement des critères de sécurité pour l'exposition.

Voir introduction générale, partie B.

##### 1.2. Définitions

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophosphoramidiques ou des acides phosphorothioiques, phosphonothioiques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase - NTE) dans les tissus nerveux.

##### 1.3. Principe de la méthode d'essai

La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à des poules domestiques pendant 28 jours. Les animaux sont observés au moins une fois par jour pour rechercher des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie, et ce jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour après administration de la dernière dose. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après la dernière administration. Deux semaines après la dernière administration, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur certains tissus nerveux.

##### 1.4. Description de la méthode d'essai

###### 1.4.1. Préparation

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard entre les lots d'expérience et les lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se déplacer librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester doit être administrée par voie orale chaque jour, sept jours sur sept, de préférence par gavage ou dans des capsules de gélatine. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

###### 1.4.2. Conditions de l'essai

###### 1.4.2.1. Animaux d'expérience

Il est recommandé d'utiliser de jeunes poules pondeuses adultes (*Gallus gallus domesticus*) âgées de 8 à 12 mois. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se déplacer librement.

#### 1.4.2.2. Nombre et sexe

En règle générale, il faut prévoir au moins trois lots d'expérience et un lot témoin recevant uniquement le véhicule. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les analyses biochimiques (trois lors de chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation post-traitement de 14 jours.

#### 1.4.2.3. Doses

Les doses doivent être sélectionnées en tenant compte des résultats d'un essai de neurotoxicité retardée après exposition aiguë et de toute autre information disponible concernant la toxicité ou la cinétique de la substance à tester. La dose la plus élevée doit être choisie dans le but de produire des effets toxiques et de préférence une neurotoxicité différée, sans entraîner la mort ni des souffrances manifestes. Il convient ensuite de définir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une dose minimale n'entraînant aucun effet observable.

#### 1.4.2.4. Essai limite

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure apparentée ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

#### 1.4.2.5. Période d'observation

Tous les animaux doivent être observés au moins une fois par jour pendant la période d'exposition et pendant les 14 jours suivants, sauf si une autopsie est prévue.

#### 1.4.3. Mode opératoire

La substance à tester est administrée tous les jours, sept jours sur sept, pendant 28 jours.

##### 1.4.3.1. Observation générale

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées attentivement au moins une fois par jour pendant les 28 jours de traitement et pendant les 14 jours suivants ou jusqu'à la date prévue de leur sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être consignés, ainsi que leur date d'apparition, leur type, leur gravité et leur durée. L'observation doit porter sur les troubles du comportement, sans toutefois s'y limiter. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être consignée. Au moins deux fois par semaine, les poules doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles, par exemple, afin de faciliter l'observation des effets toxiques minimaux. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

##### 1.4.3.2. Poids corporel

Toutes les poules sont pesées juste avant la première administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

##### 1.4.3.3. Biochimie

Six poules prélevées au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins recevant le véhicule seul sont sacrifiées quelques jours après la dernière administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies (NTE). Il peut en outre s'avérer utile de rechercher l'inhibition de cette estérase sur le nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées 24 heures après la dernière administration et trois autres 24 heures plus tard, soit 48 heures après la dernière administration; si les résultats de l'étude par exposition aiguë ou d'autres études (étude toxicocinétique, par exemple) indiquent qu'il est préférable de choisir d'autres temps de sacrifices, les temps de sacrifices seront modifiés en conséquence et les documents justificatifs seront fournis.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur ces échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

##### 1.4.3.4. Autopsie

L'autopsie de tous les animaux (sacrifice programmé ou imposé par l'état des animaux) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

##### 1.4.3.5. Examen histopathologique

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région sacro-lombaire. Des coupes devront également être réalisées dans la région distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles jumeaux du triceps, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones. Dans un premier temps, l'examen microscopique sera effectué sur les tissus conservés de tous les animaux du lot traité à la dose la plus élevée et du lot témoin. Si des effets sont mis en évidence dans le lot traité à la dose la plus élevée, l'examen microscopique devra également porter sur les tissus des animaux des lots traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

## 2. RÉSULTATS

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents critères d'évaluation retenus dans cette méthode (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou symptômes, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou symptôme aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

### 3. COMPTE RENDU

#### Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants :

#### Animaux d'expérience :

- souche utilisée,
- nombre d'animaux et âge,
- origine, conditions d'hébergement, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'expérience.

#### Conditions expérimentales :

- détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,
- justification du choix du véhicule,
- détails concernant l'administration de la substance à tester,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,
- justification du choix de la dose,
- spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,
- si les déterminations biochimiques ne sont pas pratiquées 24 et 48 heures après la dernière administration, justification du choix d'autres temps.

#### Résultats :

- données relatives au poids corporel,
- données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,
- niveau de dose sans effet néfaste observé,
- nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),
- description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,
- résultats de l'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques,
- le cas échéant, traitement statistique des résultats.

#### Discussion des résultats

#### Conclusion

### 4. RÉFÉRENCES

Cette méthode reprend la ligne directrice 419 de l'OCDE. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS

Annexe III

A. Les sections 8 et 9 du « sommaire » de l'annexe sont modifiées comme suit :

« 8. CAS PARTICULIER : SUBSTANCES

8.1. Récipients de gaz transportables

8.2. Récipients de gaz destinés au propane, au butane ou au gaz de pétrole liquéfié (GPL)

8.3. Métaux sous forme massive

8.4. Substances classées avec la phrase R 65

9. CAS PARTICULIERS : PRÉPARATIONS

9.1. Préparations gazeuses (mélanges de gaz)

9.2. Récipients de gaz destinés à des préparations contenant du propane, du butane ou du gaz de pétrole liquéfié (GPL) nauséabonds

9.3. Alliages, préparations contenant des polymères et préparations contenant des élastomères

9.4. Préparations classées avec la phrase R 65

9.5. Peroxydes organiques »

B. Le texte suivant est inclus dans la section 3.2.3 après les critères relatifs à la phrase R 20 : « Nocif par inhalation » :  
« R 65 Nocif : peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion

Les substances et préparations liquides présentant, pour l'homme, un danger en cas d'aspiration en raison de leur faible viscosité :

a) pour les substances et préparations contenant des hydrocarbures aliphatiques, alicycliques et aromatiques dans une concentration totale supérieure ou égale à 10 % et possédant :

- soit un temps d'écoulement inférieur à 30 s dans une coupe ISO de 3 mm, conformément à la norme EN 535
- soit une viscosité cinématique inférieure à  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s à 40 °C, mesurée par un viscosimètre capillaire calibré en verre conformément à la norme ISO 3104/3105
- soit une viscosité cinématique inférieure à  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s à 40 °C, déduite de mesures par viscosimètre rotatif conformément à la norme ISO 3219

Note : les substances et préparations répondant à ces critères ne nécessitent pas d'être classées si leur tension superficielle moyenne est supérieure à 25 mN/m à 40 °C.

b) pour d'autres substances et préparations ne répondant pas aux critères ci-dessus, sur la base de l'expérience pratique chez l'homme. »

C. Le texte de la section 3.2.6.3 est remplacé par le texte suivant :

« 3.2.6.3. Irritation du système respiratoire

La phrase de risque suivante sera attribuée conformément aux critères donnés ci-dessous :

R 37 Irritant pour les voies respiratoires

Substances et préparations qui causent une irritation grave du système respiratoire, sur la base :

- d'observations chez l'homme
- de résultats positifs obtenus au cours d'essais appropriés sur l'animal

Commentaires sur l'emploi de la phrase R 37

Il convient, en interprétant les observations chez l'homme, de faire la distinction entre les effets entraînant une classification avec la phrase R 48 (cf. section 3.2.4) et les effets entraînant une classification avec la phrase R 37. Les conditions entraînant normalement la classification avec R 37 sont réversibles et généralement limitées aux voies respiratoires supérieures.

Des résultats positifs obtenus au cours d'essais appropriés chez l'animal peuvent inclure des données obtenues dans un essai de toxicité générale notamment des données histopathologiques concernant le système respiratoire. On peut également utiliser des données obtenues à partir de la mesure de la bradypnée expérimentale pour évaluer l'irritation des voies respiratoires. »

D. Le texte de la section 3.2.7, « Sensibilisation », est remplacé par le texte suivant :

« 3.2.7. Sensibilisation

3.2.7.1. Sensibilisation par inhalation

Les substances et préparations seront classées sensibilisantes et caractérisées par le symbole « Xn » ;, l'indication de danger « nocif » : et la phrase de risque R 42, conformément aux critères mentionnés ci-dessous :

R 42 Peut entraîner une sensibilisation par inhalation

- s'il est établi que la substance ou préparation concernée peut provoquer une hypersensibilité respiratoire spécifique chez l'homme
- si des essais appropriés sur l'animal ont donné des résultats positifs
- si la substance est un isocyanate, sauf s'il existe des preuves qu'elle ne provoque pas d'hypersensibilité respiratoire

Commentaires concernant l'utilisation de la phrase R 42

Preuves des effets chez l'homme

Les preuves que la substance peut provoquer une hypersensibilité respiratoire spécifique seront en principe fondées sur l'expérience chez l'homme. Dans ce cadre, l'asthme est considéré comme une expression de l'hypersensibilité, mais d'autres réactions d'hypersensibilité comme la rhinite et l'alvéolite sont aussi prises en considération. Les manifestations observées devront avoir le caractère clinique d'une réaction allergique. Cependant, il n'est pas nécessaire de démontrer le caractère immunologique des mécanismes.

Lorsque les preuves proviennent de données d'exposition humaine, il est nécessaire pour décider de la classification, de tenir compte, outre les preuves fournies par les cas étudiés, des éléments suivants :

- importance de la population exposée
- étendue de l'exposition

Les preuves susmentionnées peuvent être :

- des antécédents cliniques et des résultats de tests fonctionnels respiratoires appropriés reliés à l'exposition à la substance, confirmés par d'autres preuves, par exemple :
  - une structure chimique apparentée à des substances connues pour provoquer une hypersensibilité respiratoire;
  - un test immunologique in vivo (par exemple : prick test cutané);
  - un test immunologique in vitro (par exemple, analyse sérologique);
- des études pouvant mettre en évidence d'autres mécanismes spécifiques mais non immunologiques, par exemple une irritation légère répétée, des effets liés à une action pharmacologique.
- des résultats positifs obtenus lors de tests de provocation bronchique réalisés avec la substance et effectués selon des lignes directrices reconnues pour la détermination d'une réaction d'hypersensibilité spécifique.

Les antécédents cliniques doivent comprendre à la fois les antécédents médicaux et professionnels, afin de déterminer la relation entre l'exposition à une substance particulière et le développement d'une hypersensibilité respiratoire. Les informations à prendre en compte portent notamment sur les facteurs d'aggravation aussi bien au domicile que sur le lieu de travail, sur l'apparition et l'évolution de la maladie, sur les antécédents familiaux et médicaux du patient. Les antécédents médicaux doivent également inclure la mention d'autres désordres allergiques ou respiratoires apparus depuis l'enfance, ainsi que les antécédents de tabagisme.

Les résultats positifs de tests de provocation bronchique sont considérés apporter par eux-mêmes des preuves suffisantes pour entraîner la classification. On reconnaît cependant que, dans la pratique, beaucoup des examens susmentionnés auront déjà été effectués.

Les substances qui provoquent des symptômes d'asthme par irritation uniquement chez les sujets présentant une hyperréactivité bronchique ne doivent pas être classées avec la phrase R 42.

#### Études sur l'animal

Les données expérimentales susceptibles d'indiquer pour une substance un potentiel sensibilisant par inhalation chez l'homme peuvent comprendre :

- des mesures des IgE (par exemple sur la souris)
- des réactions pulmonaires spécifiques chez le cobaye

#### 3.2.7.2. Sensibilisation par contact cutané

Les substances et préparations seront classées sensibilisantes et caractérisées par le symbole « Xi », l'indication de danger « irritant » : et la phrase de risque R 43 conformément aux critères mentionnés ci-dessous :

R 43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

- si l'expérience montre que la substance ou préparation peut provoquer une sensibilisation par contact avec la peau chez un nombre significatif de personnes
- si des essais appropriés chez l'animal donnent des résultats positifs

Commentaires concernant l'utilisation de la phrase R 43

#### Preuves d'effets chez l'homme

Les preuves suivantes (expérience pratique) sont suffisantes pour classer une substance avec la phrase R 43 :

- résultats positifs de tests épicutanés (patch tests) appropriés obtenus en principe dans plus d'une clinique dermatologique; ou,
- études épidémiologiques montrant l'apparition de dermatites de contact allergiques causées par la substance. Les circonstances dans lesquelles une forte proportion des personnes exposées manifeste des symptômes caractéristiques doivent être étudiées avec une attention particulière, même si les cas sont peu nombreux; ou,

- données positives obtenues au cours d'études expérimentales chez l'homme (cf. également 3.1.1)

Les éléments suivants sont suffisants pour classer une substance avec la phrase R 43 lorsqu'ils sont étayés par des preuves supplémentaires :

- épisodes isolés de dermatite de contact allergique, ou
- études épidémiologiques pour lesquelles les éléments liés au hasard, les biais ou les facteurs de confusion n'ont pas été exclus avec un degré raisonnable de certitude.

Les preuves supplémentaires nécessaires pour étayer les éléments ci-dessus peuvent être notamment :

- des données obtenues au cours d'essais sur l'animal réalisés selon des lignes directrices reconnues, donnant des résultats ne satisfaisant pas les critères énoncés dans la section relative aux études sur l'animal mais suffisamment proches des limites pour être considérés comme significatifs;
- des données obtenues par des méthodes non normalisées, ou
- des relations structure-activité appropriées.

#### Études chez l'animal

Des résultats positifs d'essais appropriés chez l'animal sont :

Dans le cas de la méthode d'essai de type adjuvant pour la sensibilisation de la peau décrite à l'annexe V, ou dans le cas d'autres méthodes d'essai de type adjuvant, une réponse d'au moins 30 % des animaux est considérée comme positive. Pour toute autre méthode d'essai, une réponse d'au moins 15 % des animaux est considérée comme positive.

#### 3.2.7.3. Urticaire immunologique de contact

Certaines substances répondant aux critères correspondant à la phrase R 42 peuvent en outre causer des urticaires immunologiques de contact. Dans ce cas, il convient d'introduire l'information concernant les urticaires de contact à l'aide de phrases S appropriées (généralement les phrases S 24 et S 36/37), et de la mentionner dans la fiche de données de sécurité.

Pour les substances qui produisent des signes d'urticaire immunologique de contact mais qui ne répondent pas aux critères correspondant à la phrase R 42, il convient d'envisager une classification avec la phrase R 43.

Il n'existe pas de modèle animal reconnu pour identifier les substances causant des urticaires immunologiques de contact. La classification devra donc s'appuyer sur des preuves d'effets chez l'homme, similaires à celles concernant la sensibilisation cutanée (R 43).

3.2.7.4. Il faut remarquer que si le symbole « Xn » et l'indication de danger « nocif » sont attribués, le symbole « Xi » et l'indication de danger « irritant » sont facultatifs. »

E. Le texte des critères correspondant à la phrase S 62 de la section 6 est remplacé par le texte suivant :

« S 62 En cas d'ingestion, ne pas faire vomir; consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

- Applicabilité :
- Substances et préparations classées nocives avec la phrase R 65 conformément aux critères énoncés dans la section 3.2.3,
- non applicable aux substances et préparations placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation (cf. sections 8 et 9);
- Critères d'utilisation :
- Obligatoire pour les substances et préparations susmentionnées, si elles sont vendues au public ou susceptibles d'être utilisées par le public,
- recommandé pour les substances et préparations susmentionnées utilisées dans l'industrie. »

F. La section suivante est ajoutée à la section 8 :

« 8.2. Récipients de gaz destinés au propane, au butane ou au gaz de pétrole liquéfié (GPL)

Ces substances sont classées à l'annexe I. Bien que leur classification soit conforme à l'article 1<sup>er</sup>, § 4, elles ne présentent pas de danger pour la santé humaine lorsqu'elles sont placées sur le marché, comme gaz combustibles libérés uniquement en vue de leur combustion, dans des bouteilles fermées réemplissables ou dans des cartouches non rechargeables couvertes par la norme EN 417.

Ces bouteilles et ces cartouches doivent être étiquetées avec le symbole approprié et les phrases R et S concernant l'inflammabilité. Il n'est pas requis d'indiquer sur l'étiquette les informations concernant les effets sur la santé humaine. Cependant ces informations qui auraient dû apparaître sur l'étiquette seront transmises à l'utilisateur professionnel par la personne responsable de la mise sur le marché de la substance, sous la forme prévue à l'article 9, § 2 du présent arrêté. En ce qui concerne les consommateurs, il leur sera transmis suffisamment d'informations pour leur permettre de prendre toutes les mesures nécessaires pour la santé et la sécurité, comme il est prévu à l'article 12 paragraphe 3 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

G. Le titre de la section « 8.2 Métaux sous forme massive » est remplacé par :

« 8.3. Métaux sous forme massive »

H. La section suivante est ajoutée à la section 8 :

« 8.4. Substances classées avec la phrase R 65

Pour les substances classées nocives en raison du danger en cas d'aspiration, il n'est pas nécessaire de les étiqueter « nocif » : avec la phrase R 65 si elles sont placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation. »

I. Le texte de la section 9.1.3 est remplacé par le texte suivant :

« 9.1.3. Étiquetage

Pour les récipients de gaz transportables, on considère que les prescriptions relatives à l'étiquetage sont conformes lorsqu'elles sont conformes aux dispositions de l'article 10 paragraphe 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Toutefois, par dérogation à l'article 10 paragraphes 1 et 2, pour les récipients de gaz ayant une capacité en eau inférieure ou égale à 150 litres, le format et les dimensions de l'étiquette peuvent respecter les prescriptions de la norme ISO 7225. Dans ce cas, l'étiquette peut mentionner le nom générique ou l'appellation industrielle ou commerciale de la préparation à condition que le nom des substances dangereuses entrant dans sa composition figurent de manière claire et indélébile sur le corps du récipient de gaz.

Les informations mentionnées à l'article 9 peuvent être fournies sur un disque ou une étiquette durable, solidement fixé au récipient. »

J. La section suivante est ajoutée à la section 9 :

« 9.2. Récipients de gaz destinés à des préparations contenant du propane, du butane ou du gaz de pétrole liquéfié (GPL) nauséabonds

Le propane, le butane et le gaz de pétrole liquéfié sont classés à l'annexe I. Bien que les préparations contenant ces substances soient classées conformément à l'article 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993, elles ne présentent pas de danger pour la santé humaine lorsqu'elles sont placées sur le marché, comme gaz combustibles libérés uniquement en vue de leur combustion, dans des bouteilles fermées réemplissables ou dans des cartouches non rechargeables couvertes par la norme EN 417.

Ces bouteilles et ces cartouches doivent être étiquetées avec le symbole approprié et les phrases R et S concernant l'inflammabilité. Il n'est pas requis d'indiquer sur l'étiquette les informations concernant les effets sur la santé humaine. Cependant, ces informations qui auraient dû apparaître sur l'étiquette seront transmises à l'utilisateur professionnel par la personne responsable de la mise sur le marché de la préparation sous la forme prévue à l'article 12 de l'A.R. du 11 janvier 1993. En ce qui concerne les consommateurs, il leur sera transmis suffisamment d'informations pour leur permettre de prendre toutes les mesures nécessaires pour la santé et la sécurité, comme il est prévu à l'article 12 paragraphe 3 de l'A.R. du 11 janvier 1993. »

K. Le titre de la section « 9.2 Alliages, préparations contenant des polymères et préparations contenant des élastomères » est remplacé par :

« 9.3. Alliages, préparations contenant des polymères et préparations contenant des élastomères »

L. La section suivante est ajoutée à la section 9 :

« 9.4. Préparations classées avec la phrase R 65

Pour les préparations classées nocives en raison du danger en cas d'aspiration, il n'est pas nécessaire de les étiqueter « nocif » : avec la phrase R 65 si elles sont placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation. »

M. Le titre de la section « 9.4 Peroxydes organiques », est remplacé par :

« 9.5. Peroxydes organiques »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 décembre 1998.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,  
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,  
Mme M. SMET

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,  
J. PEETERS

## 20jlage 1

## Lijst van de gevaarlijke stoffen

Als lijst van de gevaarlijke stoffen voor deze bijlage geldt de bijlage III, deel I, van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan, gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995 en door het koninklijk besluit van 14 juli 1998;

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

## ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

## Bijlage II A

## „DEEL B : METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE TOXICITEIT EN ANDERE INVLOEDEN OP DE GEZONDHEID

## ALGEMENE INLEIDING : DEEL B

## A. VERKLARENDE NOOT

Voor de doeleinden van deze richtlijn wordt de volgende nummering toegepast :

- B.15. Genmutatie - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16. Mitotische recombinatie - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17. Genmutatietest - zoogdiercellen in vitro
- B.18. DNA-beschadiging en -herstel - DNA-herstelsynthese - zoogdiercellen in vitro
- B.19. Zusterchromatiden-uitwisselingstest in vitro
- B.20. Test op recessief-letale mutaties van geslachtsgebonden genen bij *Drosophila melanogaster*
- B.21. Transformatietest op zoogdiercellen in vitro
- B.22. Test op dominant-letale mutaties bij knaagdieren
- B.23. Cytogenetisch onderzoek van geslachtscellen van zoogdieren in vivo
- B.24. Vlekkentest op muizen
- B.25. Erfelijke translocaties bij de muis
- B.26. Subchronische orale toxiciteitstest : 90-daagse herhaalde orale toediening aan knaagdiersoorten
- B.27. Subchronische orale toxiciteitstest : 90-daagse herhaalde orale toediening aan niet-knaagdiersoorten
- B.28. Subchronische dermale toxiciteitstest : 90-daagse herhaalde dermale toediening aan knaagdiersoorten
- B.29. Subchronische inhalatietoxiciteitstest : 90-daagse herhaalde inhalatoire toediening aan knaagdiersoorten
- B.30. Chronische-toxiciteitstest
- B.31. Teratogeniteitstest bij knaagdieren en niet-knaagdieren
- B.32. Carcinogeniteitstest
- B.33. Gecombineerde test op chronische toxiciteit en carcinogeniteit
- B.34. Test op reproductietoxiciteit over één generatie
- B.35. Test op reproductietoxiciteit over twee generaties
- B.36. Toxicokinetica

## B. ALGEMENE DEFINITIES VAN DE BEGRIPPEN DIE GEBRUIKT WORDEN BIJ DE TESTMETHODEN IN DEZE BIJLAGE

i) Acute toxiciteit omvat de schadelijke effecten die binnen een gegeven tijd (meestal 14 dagen) na de toediening van een enkelvoudige dosis van een stof optreden.



ii) Manifeste toxiciteit is een algemene term die duidelijke toxiciteitsverschijnselen beschrijft die optreden na de toediening van de teststof. Deze verschijnselen moeten een risicobepaling mogelijk maken en van een zodanige aard zijn dat verwacht mag worden dat bij een hogere toegediende dosis ernstige toxische verschijnselen en waarschijnlijk sterfte optreden.

iii) Dosis is de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht (gram of milligram) of als het gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bij voorbeeld mg per kg lichaamsgewicht) of als constante concentratie in het dieet (ppm, delen per miljoen of mg per kg voedsel).

iv) Discriminerende dosis is het hoogste van de vier vaste dosisniveaus dat kan worden toegediend zonder dat met de teststof verband houdende sterfte wordt veroorzaakt (met inbegrip van de proefdieren die moeten worden afgemaakt).

v) Dosering is een algemeen begrip dat de dosis, de frequentie en de duur van de toediening omvat.

vi) LD<sub>50</sub> (letale-dosismediaan) is de statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis hebben ontvangen de dood intreedt. De LD<sub>50</sub>-waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (mg/kg).

vii) LC<sub>50</sub> (letale-concentratie-mediaan) is de statistisch vastgestelde concentratie van een stof waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de gedurende een bepaalde tijd blootgestelde dieren, tijdens de blootstelling of binnen een bepaalde tijd na de blootstelling de dood intreedt.

De LC<sub>50</sub>-waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per standaardvolume lucht (mg/l).

viii) NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) is de afkorting voor de hoogste dosis of het hoogste niveau van blootstelling waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden die verband houden met de behandeling.

ix) Subchronische toxiciteit bij herhaalde dosis omvat de schadelijke effecten die optreden bij proefdieren ten gevolge van herhaalde dagelijkse toediening van, of blootstelling aan een chemische stof gedurende een kort gedeelte van hun verwachte levensduur.

x) De maximale verdraagbare dosis (Maximum Tolerated Dose - MTD) is het hoogste dosisniveau dat tekenen van toxiciteit bij proefdieren tot gevolg heeft zonder dat dit belangrijke gevolgen heeft voor de overleving in de test waarin ze wordt gebruikt.

xi) Huidirritatie is het ontstaan van een ontstekingsreactie in de huid door het toedienen van een teststof op de huid.

xii) Oogirritatie is het ontstaan van veranderingen in het oog door het toedienen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog.

xiii) Sensibilisatie van de huid (allergische contactdermatitis) is een via het immuunsysteem veroorzaakte reactie van de huid op een stof.

xiv) Huidaantasting is het optreden van irreversibele huidweefselbeschadiging na het toedienen van een teststof gedurende een periode van 3 minuten tot 4 uur.

xv) Toxicokinetica is de bestudering van de absorptie, de distributie, het metabolisme en de excretie van teststoffen.

xvi) Absorptie is het (geheel van) proces(sen) waardoor een toegediende stof het lichaam binnenkomt.

xvii) Excretie is het (geheel van) proces(sen) waardoor de toegediende stof en/of de metabolieten daarvan door het lichaam worden uitgescheiden.

xviii) Distributie is het (geheel van) proces(sen) waardoor de geabsorbeerde stof en/of de metabolieten daarvan over het lichaam worden verdeeld.

xix) Metabolisme is het (geheel van) proces(sen) waardoor de toegediende stoffen in het lichaam chemisch worden veranderd door enzymatische of niet-enzymatische reacties.

B.I Acute toxiciteit, subchronische toxiciteit bij herhaalde dosis en chronische toxiciteit.

De acute toxicologische effecten en de orgaan- of systeemtoxiciteit van een stof kunnen worden vastgesteld via een aantal toxiciteitstesten (methoden B.1-B.5) waarmee, na toediening van een enkele dosis, een eerste indicatie van de toxiciteit kan worden verkregen.

Afhankelijk van de toxiciteit van de stof kan worden overwogen een limietproef in plaats van een volledige LD<sub>50</sub> uit te voeren. Er is echter geen limietproef gespecificeerd bij inhalatieonderzoek omdat het niet mogelijk is gebleken om een ondubbelzinnige blootstellingslimiet bij inhalatie te definiëren.

Bij voorkeur moeten methoden worden toegepast waarbij zo weinig mogelijk proefdieren worden gebruikt en waarbij ongerief en pijn de proefdieren worden geminimaliseerd, bij voorbeeld door gebruik van de vaste-dosismethode (methode B.1 bis) en de bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (methode B.1 ter). Bij proeven op het eerste niveau kunnen de resultaten van het eerste onderzoek worden aangevuld door onderzoek bij een tweede diersoort. In dit geval kan een standaard-testmethode worden gebruikt of kan de methode worden aangepast voor een kleiner aantal proefdieren.

De toxiciteitstest door herhaalde toediening (methoden B.7, B.8 en B.9) omvat de evaluatie van toxische effecten die het gevolg zijn van herhaalde blootstelling. Van groot belang is nauwkeurige klinische observatie van de proefdieren om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. Door deze proeven moet het mogelijk worden om de toxicologische doelwitorganen alsmede de toxische en niet-toxische doses te bepalen. Verder gedetailleerd onderzoek van deze aspecten kan nodig zijn in onderzoek op langere termijn (methoden B.26-B.30 en B.33).

## B.II Mutageniteit - Genotoxiciteit

Mutageniteit heeft betrekking op het veroorzaken van permanente erfelijke veranderingen in de hoeveelheid of de structuur van het erfelijk materiaal van cellen of organismen. Deze veranderingen (mutaties) kunnen een enkel gen of gensegment, een genenblok of één of meer volledige chromosomen betreffen. De chromosomale effecten kunnen van structurele en/of numerieke aard zijn.

De mutagene activiteit van een stof wordt in vitro vastgesteld voor puntmutaties bij bacteriën (methoden B.13/14) en/of voor structurele chromosoomafwijkingen bij zoogdiercellen (methode B.10).

Ook in vivo procedures, zoals de micronucleustest (methode B.12) of de metafaseanalyse bij beenmergcellen (methode B.11) zijn aanvaardbaar. Bij afwezigheid van contra-indicaties hebben de in vitro methoden echter verre de voorkeur.

Voor hogere produktievolumes en/of met het oog op de uitvoering of nadere uitwerking van een risicobeoordeling, kunnen aanvullende onderzoeken van de mutageniteit en pre-screening op carcinogeniteit nodig zijn. Deze kunnen voor een aantal doelen worden gebruikt : om resultaten van de basistests te bevestigen, om parameters te evalueren die niet in de basistests zijn onderzocht en om in vivo onderzoek op te zetten of uit te breiden.

Hiertoe omvatten de methoden B.15 tot B.25 zowel in vivo als in vitro eukaryotische systemen en een uitgebreide reeks biologische parameters („end-points“). Deze proeven geven informatie over puntmutaties en andere parameters in organismen die complexer zijn dan de bacteriën die in de basistests worden gebruikt.

Als een programma van verder mutageniteitsonderzoek wordt overwogen, moet de opzet in principe zodanig zijn dat relevante aanvullende informatie over de mogelijke mutagene en/of carcinogene eigenschappen van de stof wordt verkregen.

Welk onderzoek in een bepaald geval geschikt is hangt af van een groot aantal factoren zoals : de chemische en fysische eigenschappen van de stof, de resultaten van voorafgaand bacteriologisch en cytogenetisch onderzoek, het metabolisch profiel van de stof, de resultaten van andere toxiciteitsonderzoeken en de toepassingen van de stof voor zover deze bekend zijn. In het licht van de verscheidenheid van factoren die eventueel nader onderzoek verdienen, is het niet gewenst om ten aanzien van de aard van de uitgevoerde proeven strikte regels vast te stellen.

In KB van 13 november 1997 is een aantal algemene beginselen vastgelegd. Duidelijke teststrategieën kunnen worden gevonden in de technische leidraad met betrekking tot risicobepaling; die is echter flexibel en kan naar behoefte worden aangepast aan specifieke omstandigheden.

Hieronder zijn methoden voor verder onderzoek opgesomd op basis van het voornaamste genetische criterium.

Onderzoek op gen(punt)mutaties

a) Vooruit- of terugmutatieonderzoek waarbij eukaryotische micro-organismen (*Saccharomyces cerevisiae*) worden gebruikt (methode B.15)

b) In vitro onderzoek op vooruitmutaties bij zoogdiercellen (methode B.17)

c) Bepaling van recessief-letale mutaties van geslachtsgebonden genen bij *Drosophila melanogaster* (methode B.20)

d) In vivo bepaling van somatische mutaties, vlekentest op muizen (methode B.24)

Onderzoek op chromosoomafwijkingen

a) In vivo cytogenetische tests op zoogdieren; in vivo metafaseanalyse van beenmergcellen kan worden overwogen als dit niet bij het eerste onderzoek is gedaan (methode B.11). Verder kan in vivo cytogenetisch onderzoek worden verricht op geslachtscellen (methode B.23)

b) In vitro cytogenetische tests op zoogdiercellen als dit niet bij het eerste onderzoek is gedaan (methode B.10)

c) Onderzoek op dominant-letale mutaties bij knaagdieren (methode B.22)

d) Onderzoek op erfelijke translocaties bij muizen (methode B.25)

Genotoxische effecten - effecten op DNA

Genotoxiciteit, waaronder wordt verstaan de mogelijk schadelijke effecten op genetisch materiaal die niet direct geassocieerd zijn met mutageniteit, kan worden aangetoond als schade aan het DNA zonder directe tekenen van mutatie. De volgende methoden, die gebruik maken van eukaryotische micro-organismen of zoogdiercellen, kunnen voor dergelijk onderzoek worden gebruikt :

a) Mitotische recombinatie bij *Saccharomyces cerevisiae* (methode B.16)

b) DNA-beschadiging en -herstel - DNA-herstelsynthese - zoogdiercellen in vitro (methode B.18)

c) Zusterchromatidenuitwisseling bij zoogdiercellen in vitro (methode B.19)

Alternatieve methoden voor onderzoek naar mogelijke carcinogeniteit

Er zijn transformatietests voor zoogdiercellen beschikbaar die het vermogen meten van een stof om in celculturen morfologische en gedragsveranderingen te veroorzaken die waarschijnlijk samenhangen met kwaadaardige veranderingen in vivo (methode B.21). Er kunnen verschillende celtypes en verschillende transformatiecriteria worden gebruikt.

Risicobeoordeling van erfelijke effecten bij zoogdieren

Er bestaan methoden voor het meten van erfelijke effecten bij zoogdieren die worden veroorzaakt door gen(punt)mutaties, bij voorbeeld de specifieke-locustest bij muizen, voor het meten van geslachtscelmutaties bij de eerste generatie (niet in deze bijlage opgenomen), en voor chromosoomafwijkingen, bij voorbeeld de test op erfelijke translocatie bij muizen (methode B.25). Dergelijke methoden kunnen worden gebruikt bij het evalueren van het genetisch risico van een stof voor de mens. Gezien de complexiteit van deze onderzoeken en het zeer grote aantal benodigde proefdieren, zeker bij de specifieke-locustest, zijn echter goede redenen nodig om deze uit te voeren.

### B.III Carcinogeniteit

Chemische stoffen kunnen, afhankelijk van het veronderstelde werkingsmechanisme, worden getypeerd als wel- of niet-genotoxische carcinogenen.

Het onderzoek op mutageniteit/genotoxiciteit kan reeds informatie over het genotoxisch-carcinogene vermogen van een stof opleveren nog vóór een screening wordt uitgevoerd. Aanvullende informatie kan worden verkregen uit subchronische of chronische toxiciteitstest waarbij herhaalde doses worden toegediend. De toxiciteitstest met herhaalde toediening, methode B.7 en onderzoeken met langer herhaalde doses omvatten de bepaling van histopathologische veranderingen, bij voorbeeld hyperplasie in bepaalde weefsels, die een aanwijzing kunnen vormen. Deze onderzoeken en toxicologische gegevens kunnen bijdragen tot het identificeren van stoffen met mogelijke carcinogeniteit, waarna dit aspect eventueel grondiger moet worden onderzocht via een carcinogeniteitstest (methode B.32) of vaak ook een gecombineerd onderzoek op chronische toxiciteit en carcinogeniteit (methode B.33).

### B.IV Reproductietoxiciteit

Reproductietoxiciteit kan op verschillende manieren worden vastgesteld, bij voorbeeld door verslechtering van de mannelijke en vrouwelijke voortplantingsfuncties of -capaciteit, „effecten op de vruchtbaarheid” genoemd. Dit laatste aspect omvat ook teratogeniteit en effecten die optreden tijdens de lactatie.

Bij onderzoek op teratogeniteit, als onderdeel van onderzoek op ontwikkelingstoxiciteit, is de onderzoeksmethode (methode B.31) voornamelijk gericht op toediening via orale weg. Als alternatief kunnen ook andere wegen gekozen worden, afhankelijk van de fysische eigenschappen van de te onderzoeken teststof of de waarschijnlijke wijze van blootstelling bij de mens. In zulke gevallen moet de methode op een passende manier gewijzigd worden met inachtneming van de relevante elementen van de 28-daagse testmethode.

Als een voortplantings(vruchtbaarheids)onderzoek over drie generaties nodig is kan de beschreven methode voor voortplantingsonderzoek over twee generaties (methode B.35) tot drie generaties worden verlengd.

#### B.V Neurotoxiciteit

Neurotoxiciteit kan op verschillende manieren worden vastgesteld, bij voorbeeld door functionele veranderingen en/of structurele en biochemische veranderingen in het centrale of het perifere zenuwstelsel. Een eerste indicatie van neurotoxiciteit kan worden verkregen uit onderzoek naar acute toxiciteit. De toxiciteitstest met herhaalde toediening (methode B.7) houdt ook het vaststellen van neurotoxicologische effecten in, en de nadruk moet worden gelegd op nauwkeurige klinische waarnemingen om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. De methode moet het mogelijk maken om stoffen te identificeren die een neurotoxische werking kunnen hebben, waarna verder, diepgaand onderzoek naar dit aspect nodig kan zijn. Verder is het van belang om rekening te houden met de mogelijkheid dat stoffen een specifieke neurotoxische werking kunnen hebben die met ander toxiciteitsonderzoek niet ontdekt kan worden. Bij bepaalde organische fosforverbindingen is bij voorbeeld een vertraagde neurotoxische werking ontdekt die vastgesteld kan worden met de methoden B.37 en B.38 na enkelvoudige of herhaalde blootstelling.

#### B.VI Immunotoxiciteit

Immunotoxiciteit kan op verschillende manieren worden vastgesteld, bij voorbeeld door immunosuppressie en/of verhoging van de gevoeligheid van het immuunsysteem welke hypersensitiviteit of geïnduceerde auto-immuniteit tot gevolg heeft. De toxiciteitstest met herhaalde toediening (methode B.7) houdt onder meer het vaststellen van immunotoxische effecten in. De methode moet het mogelijk maken stoffen te identificeren die een immunotoxische werking kunnen hebben, waarna verder, diepgaand onderzoek naar dit aspect nodig kan zijn.

#### B.VII Toxicokinetica

Toxicokinetisch onderzoek is een ondersteuning bij de interpretatie en evaluatie van toxiciteitsgegevens. Dit onderzoek dient om licht te werpen op bepaalde aspecten van de toxiciteit van de onderzochte stoffen en de resultaten kunnen worden gebruikt bij het opzetten van voortgezet toxiciteitsonderzoek. Het is niet de bedoeling dat in alle gevallen alle parameters worden bepaald. Zelden zal de gehele reeks toxicokinetische onderzoeken (absorptie, excretie, distributie en metabolisme) nodig zijn. Bij bepaalde verbindingen kan een andere volgorde de voorkeur verdienen, of kan worden volstaan met een onderzoek waarbij één enkele dosis wordt toegediend (methode B.36).

Informatie over de chemische structuur (SAR) en fysisch-chemische eigenschappen kan ook een indicatie geven over de absorptiekenmerken langs de voorgestelde toedieningsweg en over de te verwachten metabolische reacties en de verdeling over de weefsels. Over de toxicokinetische parameters kan ook informatie beschikbaar zijn door voorafgaand toxiciteitsonderzoek en toxicokinetisch onderzoek.

### C. KARAKTERISERING VAN DE TESTSTOF

De samenstelling van de teststof, met inbegrip van de voornaamste verontreinigingen, en de relevante fysisch-chemische eigenschappen, waaronder de stabiliteit, moeten vóór de aanvang van ieder toxiciteitsonderzoek bekend zijn.

De fysisch-chemische eigenschappen van de teststof leveren belangrijke informatie over de keuze van de manier van toedienen, de opzet van ieder afzonderlijk onderzoek en het hanteren en bewaren van de teststof.

Alvorens het onderzoek wordt aangevat, moet een analytische methode voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof (zo mogelijk met inbegrip van de voornaamste verontreinigingen) in het toedieningsmedium en in het biologisch materiaal ontwikkeld worden.

Alle gegevens met betrekking tot de identificatie, de fysisch-chemische eigenschappen, de zuiverheid en het gedrag van de teststof moeten in het onderzoeksrapport worden opgenomen.

### D. VERZORGING VAN DE DIEREN

Bij toxiciteitstests zijn een stringente bewaking van de levensomstandigheden en een goede verzorging van de dieren een eerste vereiste.

#### i) Huisvesting

De leefomstandigheden in de kamers of ruimten waar de proefdieren zijn ondergebracht, moeten geschikt zijn voor het soort proefdier. Voor ratten, muizen en cavia's is een kamertemperatuur van  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  en een relatieve luchtvochtigheid van 30-70 % geschikt; voor konijnen moet de temperatuur  $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  en de relatieve luchtvochtigheid 30-70 % bedragen.

Sommige experimentele technieken zijn bijzonder gevoelig voor temperatuureffecten; in dergelijke gevallen wordt in de beschrijving van de onderzoeksmethode nader ingegaan op de correcte proefomstandigheden. Bij ieder onderzoek naar toxische effecten moeten de temperatuur en de vochtigheidsgraad worden gecontroleerd, opgetekend en in het eindverslag van de studie worden opgenomen.

Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met afwisselend twaalf uur licht - twaalf uur duisternis. Nadere gegevens over de verlichting moeten worden opgetekend en in het eindverslag worden opgenomen.

Tenzij anders bij de methode vermeld, worden de dieren hetzij afzonderlijk, hetzij in kleine groepen van hetzelfde geslacht gehuisvest. In het laatste geval mogen per kooi niet meer dan vijf dieren worden gehuisvest.

Het is belangrijk om in verslagen over dierproeven steeds te vermelden welk soort kooien is gebruikt en hoeveel dieren tijdens de blootstelling aan de chemische stof en tijdens latere waarnemingsperioden in iedere kooi waren gehuisvest.

#### ii) Voeding

Bij de samenstelling van het voedsel moet worden voldaan aan alle eisen die de proefdiersoorten aan hun voeding stellen. Indien chemische stoffen via de voeding aan de dieren worden toegediend, kan de voedingswaarde door interactie tussen de stof en een bestanddeel van de voeding verminderd worden. Bij het interpreteren van de resultaten dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van dergelijke reacties. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk laboratoriumvoeder met een onbepaalde hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voedsel kan mede worden bepaald door de noodzaak de teststof, wanneer die via het voedsel wordt toegediend, op een passende wijze daarmee te vermengen.

Onzuiverheden in de voeding waarvan bekend is dat ze de toxiciteit beïnvloeden, mogen niet in werkzame concentraties voorkomen.

### E. WELZIJN VAN DE DIEREN

Bij het uitwerken van de testmethoden werd extra aandacht besteed aan dierenwelzijn. Enkele voorbeelden worden hieronder samengevat, maar deze lijst is niet volledig. De exacte formulering en/of voorwaarden dienen te worden nagelezen in de tekst van de methoden :

- Voor de bepaling van de acute orale toxiciteit moeten twee alternatieve methoden, de „vaste-dosismethode” en de „bepaling van de acute-toxiciteitsklasse” worden overwogen. Bij de eerste methode wordt niet uitgegaan van de dood als specifiek criterium en bij deze methode worden minder proefdieren gebruikt. Bij de tweede methode wordt gemiddeld 70 % minder proefdieren gebruikt dan bij methode B.1 ter bepaling van de acute orale toxiciteit. Beide alternatieve methoden veroorzaken minder ongerief en pijn dan de klassieke methode.

- Het aantal proefdieren is teruggebracht tot het wetenschappelijk aanvaardbare minimum : slechts vijf proefdieren van hetzelfde geslacht worden per dosisniveau getest voor de methoden B.1 en B.3; slechts tien dieren (en maar vijf voor de negatieve controlegroep) worden gebruikt voor de bepaling van de sensibilisering van de huid door de maximalisatietest voor cavia's (methode B.6); het aantal dieren dat benodigd is voor de positieve controle bij het testen van de mutageniteit in vivo wordt ook verminderd (methoden B.11 en B.12).

- Ongerief en pijn van de dieren tijdens de proef worden tot een minimum teruggebracht; het kan nodig zijn dieren die ernstige, blijvende verschijnselen van lijden en pijn vertonen op humane wijze af te maken; het doseren van teststoffen volgens een methode waarvan bekend is dat zij veel lijden en pijn veroorzaken wegens de corrosieve of irriterende eigenschappen van de stof, is niet vereist (methoden B.1, B.2 en B.3).

- Het testen met irrelevant hoge doses wordt vermeden door het invoeren van limietproeven, niet alleen bij de tests op acute toxiciteit (methoden B.1, B.2 en B.3) maar ook bij de in vivo tests op mutageniteit (methoden B.11 en B.12).

- Een strategie voor irritatietests maakt het thans mogelijk een test achterwege te laten of de studie te beperken tot een enkel dier wanneer voldoende wetenschappelijke gegevens voorhanden zijn.

Deze wetenschappelijke gegevens kunnen worden gebaseerd op de fysisch-chemische eigenschappen van de stof, de resultaten van andere reeds uitgevoerde proeven of de resultaten van goed gevalideerde in vitro proeven. Indien bij voorbeeld bij het uitvoeren van een onderzoek naar acute toxiciteit bij toediening via de huid geen huidirritatie werd waargenomen bij de limietdosis van de te onderzoeken stof (methode B.3), kan verder testen op huidirritatie (methode B.4) overbodig zijn; stoffen die duidelijk bijtende of ernstige huidirriterende eigenschappen vertonen bij het onderzoek naar huidirritatie (methode B.4), dienen niet verder te worden getest op oogirritatie (methode B.5).

### F. ALTERNATIEVE TESTEN

Een wetenschappelijke doelstelling van de Europese Unie is het ontwikkelen en valideren van alternatieve technieken die dezelfde hoeveelheid informatie opleveren als de huidige dierproeven, maar waarbij minder proefdieren worden gebruikt, die minder lijden veroorzaken of die het gebruik van dieren volledig overbodig maken.

Naarmate dergelijke methoden ter beschikking komen, moet het gebruik ervan waar mogelijk worden overwogen voor de risicobeoordeling en de daaruit voortvloeiende classificatie en etikettering ten aanzien van de intrinsieke risico's.

### G. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Bij de evaluatie en interpretatie van de testresultaten moet rekening worden gehouden met de beperkingen ten aanzien van de mate waarin de resultaten van dierproeven en in vitro tests kunnen worden geëxtrapoleerd naar de mens. Daarom kunnen aanwijzingen voor schadelijke effecten bij de mens, indien beschikbaar, gebruikt worden als bevestiging van de testresultaten.

Deze resultaten kunnen worden gebruikt voor de classificatie en etikettering van nieuwe en bestaande chemische stoffen met betrekking tot hun effecten op de menselijke gezondheid op basis van de intrinsieke eigenschappen die met deze methoden geïdentificeerd en gekwantificeerd worden. De criteria voor classificatie en etikettering in de desbetreffende bijlage IV hebben mede betrekking op de „end-points” van de testprotocollen die bij deze testmethoden horen.

Deze resultaten kunnen ook worden gebruikt voor onderzoek gericht op de risicobeoordeling van nieuwe en bestaande chemische stoffen. De voor deze doeleinden gepaste teststrategieën zijn aangegeven in de desbetreffende documenten met richtsnoeren.

#### H. LITERATUUR

De meeste van deze methoden zijn ontwikkeld binnen het kader van het OESO-programma inzake richtsnoeren voor het testen; zij moeten worden toegepast overeenkomstig de beginselen van „goede laboratoriumpraktijken”, om zoveel mogelijk te komen tot „onderlinge acceptatie van gegevens”.

Verdere informatie kan worden gevonden in de referenties die te vinden zijn in de OESO-richtsnoeren en in relevante literatuur die elders is gepubliceerd. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

#### ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,

M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,

Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,

J. PEETERS

#### Bijlage II B

##### „B.1ter ACUTE ORALE TOXICITEIT - METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE

#### 1. METHODE

##### 1.1. Inleiding

De methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse geeft informatie ten behoeve van zowel risicobeoordeling als risicoclassificatie.

Bij de methode worden drie vaste doses gebruikt die voldoende ver uit elkaar liggen om een stof in te kunnen delen met behulp van de resultaten van het onderzoek. Verder kunnen in de door deze testmethode beschreven procedure nog drie aanvullende vaste doses gekozen worden die gebruikt kunnen worden als alternatieve opties op gegeven beslispunten of als opties voor verdere proeven. Het gebruik van (een of meer) aanvullende doses kan overwogen worden als een verdere verfijning wenselijk of noodzakelijk is.

Bij de methode wordt gebruik gemaakt van drie vastgestelde begindoses. Het is niet de bedoeling om een exacte LD<sub>50</sub> te berekenen maar om een blootstellingsbereik te bepalen waarbij mortaliteit kan worden verwacht, daar de dood van een aantal proefdieren nog steeds het hoofdcriterium van deze test is. De resultaten van deze test moeten volgens de criteria van bijlage IV geïdentificeerd kunnen worden. Ten gevolge van de sequentiële aanpak kan de duur van de test langer zijn dan die van de in B.1 beschreven procedure. Het grote voordeel van deze methode is dat een kleiner aantal proefdieren nodig is dan in de acute-toxiciteitstest (oraal) (B.1) en de alternatieve vaste-dosismethode (B.1bis).

Zie ook de algemene inleiding deel B.

##### 1.2. Definities

Zie algemene inleiding deel B.

##### 1.3. Principe van de testmethode

De stof wordt in een van de vastgestelde doses oraal toegediend aan een groep proefdieren. De stof wordt getest met behulp van een getrapte procedure waarbij bij iedere stap drie dieren van hetzelfde geslacht worden gebruikt. Het is niet nodig om een voorstudie te doen. Het al dan niet voorkomen van door de stof veroorzaakte mortaliteit bepaalt de volgende stap, d.w.z. :

- verder testen is niet nodig
- de volgende stap wordt uitgevoerd met dezelfde dosis, maar met dieren van het andere geslacht
- de volgende stap wordt uitgevoerd met de eerstvolgende hogere of de eerstvolgende lagere dosis

##### 1.4. Beschrijving van de testmethode

###### 1.4.1. Voorbereiding

Er wordt een aselechte steekproef samengesteld van gezonde jonge volwassen dieren. Deze worden gemerkt voor individuele herkenning en vóór het begin van de test ten minste vijf dagen in hun kooien gehouden ter acclimatisatie aan de laboratoriumomstandigheden. Dieren van hetzelfde geslacht die dezelfde dosis krijgen, mogen in één kooi worden ondergebracht maar het aantal dieren per kooi mag niet zo groot zijn dat duidelijke waarneming van ieder dier afzonderlijk belemmerd wordt.

De teststof wordt in een enkele dosis toegediend met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule.

Zo nodig wordt de teststof in een geschikt vehiculum opgelost of gesuspendeerd. Het verdient aanbeveling om zo mogelijk gebruik te maken van een oplossing/suspensie in water. Als dat niet mogelijk is, kan naar olie (bij voorbeeld maisolie) of in laatste instantie naar een ander vehiculum worden gegrepen. Van niet-waterige media moeten de toxicologische eigenschappen bekend zijn; als dat niet het geval is moeten deze eigenschappen vóór de test worden vastgesteld.

Voor het toedienen van de dosis dienen de proefdieren te vasten. Aan ratten wordt gedurende de voorafgaande nacht geen voedsel verstrekt, voor muizen geldt een periode van 3-4 uur. Water mag onbeperkt worden gegeven.

#### 1.4.2. Proefomstandigheden

##### 1.4.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Bij het begin van de studie moet de gewichtsvariatie van de dieren minimaal zijn; het gewicht van ieder dier mag ten hoogste 20 % van het gemiddelde voor zijn geslacht afwijken.

##### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

Voor iedere stap worden drie dieren van hetzelfde geslacht gebruikt. Voor de eerste stap mag het geslacht vrij worden gekozen.

##### 1.4.2.3. Dosisniveaus

Het initiële dosisniveau wordt gekozen uit één van drie vaste dosisniveaus, bij voorbeeld 25, 200 en 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. De begin dosis moet zo zijn, dat waarschijnlijk bij ten minste een aantal van de blootgestelde proefdieren mortaliteit optreedt. Afhankelijk van de begin dosis wordt één van de in bijlage 1 opgenomen stroomschema's gevolgd.

Bij het kiezen van het geslacht en de begin dosis moet alle beschikbare informatie gebruikt worden, met inbegrip van die over relaties tussen structuur en activiteit. Als op grond van die informatie vermoed wordt dat waarschijnlijk bij het hoogste dosisniveau (2 000 mg/kg lichaamsgewicht) geen mortaliteit zal optreden, moet een limiettest uitgevoerd worden. Als over een teststof geen informatie beschikbaar is, wordt met het oog op het welzijn van de proefdieren een startdosis van 200 mg/kg lichaamsgewicht aanbevolen.

Soms kan het wenselijk zijn de informatie meer te verfijnen dan met het uitvoeren van de proef met drie vaste dosisniveaus van 25, 200 en 2 000 mg/kg lichaamsgewicht mogelijk zou zijn. In die gevallen kan overwogen worden om verder te testen met bijkomende vaste dosisniveaus van 5, 50 of 500 mg/kg lichaamsgewicht.

Doses waarvan bekend is dat zij hevige pijn en ongemak veroorzaken door bijtende of sterk irriterende werking, behoeven niet te worden toegediend.

Het tijdsinterval tussen de blootstelling van de opeenvolgende groepen wordt bepaald door de aanvang, de duur en de hevigheid van de toxische verschijnselen. Blootstelling van proefdieren van het andere geslacht, of blootstelling aan een volgende dosis moet worden uitgesteld totdat men zeker is van het overleven van de proefdieren die de vorige dosis toegediend hebben gekregen.

##### 1.4.2.4. Limiettest

Een limiettest met een dosisniveau van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht kan worden uitgevoerd met drie proefdieren van elk geslacht. Als mortaliteit optreedt ten gevolge van de toediening van de teststof kan het nodig zijn om verder te testen met een dosis van 200 of 500 mg/kg lichaamsgewicht.

##### 1.4.2.5. Observatieperiode

De proefdieren moeten doorgaans 14 dagen worden geobserveerd, behalve wanneer dieren uit het onderzoek moeten worden verwijderd en op humane wijze worden afgemaakt uit welzijnsoverwegingen of omdat zij dood worden aangetroffen. De duur van deze observatieperiode moet echter niet streng vastgelegd worden. Deze moet worden bepaald door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel, en kan dus worden verlengd als dat nodig is. De tijdstippen waarop toxische verschijnselen merkbaar worden en weer verdwijnen zijn van belang, zeker als er een bepaalde tendens tot vertraagde toxiciteit wordt vastgesteld. Alle waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd, waarbij voor ieder dier een apart verslag wordt bijgehouden.

#### 1.4.3. Procedure

Na de periode van voedselonthouding moeten de dieren vóór de toediening van de teststof worden gewogen. Na toediening van de teststof kan nog gedurende 3-4 uur voedsel onthouden worden. Als een dosis in gedeelten over een langere tijd wordt toegediend kan het nodig zijn de dieren van voedsel en water te voorzien, afhankelijk van de duur van die periode.

Het maximale vloeistofvolume dat per keer kan worden toegediend hangt af van de grootte van de proefdieren. Bij knaagdieren mag het volume doorgaans niet meer dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht bedragen; in het geval van waterige oplossingen kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht aanvaardbaar zijn. Variaties in het testvolume moeten geminimaliseerd worden door het aanpassen van de concentratie zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante volume kan worden gebruikt. Als een enkelvoudige dosis niet mogelijk is, kan de dosis gedurende een periode van minder dan 24 uur in kleinere gedeelten worden toegediend.

Bijzonderheden van de testprocedure worden beschreven in bijlage 1.

##### 1.4.3.1. Algemene observaties

Op de dag van de toediening moeten minimaal tweemaal - en eventueel vaker, als de reactie van de dieren op de behandeling dat nodig maakt - nauwkeurige klinische observaties worden verricht, en vervolgens minstens één keer daags. Dieren die stervende zijn of dieren die hevige pijn lijden of persistente tekenen van ernstige nood vertonen moeten op humane wijze worden afgemaakt. Dieren die om ethische redenen zijn afgemaakt worden beschouwd als dieren die door de teststof zijn gestorven.

Als dieren om ethische redenen worden gedood of dood worden aangetroffen, moet het tijdstip hiervan zo nauwkeurig mogelijk worden genoteerd. Wanneer de dieren aanhoudende verschijnselen van toxiciteit vertonen moeten aanvullende waarnemingen worden verricht. Onder meer moet gelet worden op veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen en ook bij de ademhaling, de bloedsomloop en het autonome en centrale zenuwstelsel alsmede de somatomotorische activiteit en het gedrag. Er moet gelet worden op bevingen, stuip trekkingen, kwijlen, diarree, lethargie, slaap en coma.

Alle waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd, waarbij voor ieder dier een apart rapport wordt bijgehouden.

#### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht

Elk dier moet kort voor de teststof wordt toegediend worden gewogen en daarna ten minste eenmaal per week. Veranderingen in gewicht moeten worden berekend en bijgehouden. Bij de beëindiging van de test moeten de overlevende dieren worden gewogen alvorens ze op humane wijze worden afgemaakt.

#### 1.4.3.3. Macroscopische necropsie

Op alle proefdieren, met inbegrip van de dieren die tijdens de test sterven of die uit de test worden verwijderd, moet een macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Alle macroscopische pathologische veranderingen moeten voor elk proefdier worden vastgelegd. Als organen van proefdieren die 24 uur of meer in leven zijn gebleven, macroscopische pathologische veranderingen vertonen kan ook microscopische necropsie worden overwogen omdat dat bruikbare informatie kan opleveren.

### 2. GEGEVENS

Van ieder dier moeten individuele gegevens beschikbaar gemaakt worden. Verder moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen waarbij voor iedere testgroep wordt geregistreerd : het gebruikte aantal proefdieren, het aantal dat tekenen van toxiciteit heeft vertoond, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om ethische redenen is afgemaakt, het tijdstip van sterven van ieder dier, een beschrijving en het verloop in de tijd van de toxische effecten (inclusief de eventuele reversibiliteit daarvan), en de resultaten van de necropsie.

Algemene richtsnoeren voor de interpretatie van de resultaten met het oog op de classificatie worden gegeven in bijlage 2.

### 3. RAPPORTAGE

Verslag van de proefnemingen

In dit verslag dienen, voor zover mogelijk, de volgende gegevens te worden opgenomen :

Proefdieren :

- diersoort, stam;
- microbiologische status van de dieren, indien bekend;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, behuizing, voeding enz.;
- het gewicht van elk dier afzonderlijk bij de aanvang van de test, wekelijks daarna en bij het einde van de test.

Proefomstandigheden :

- motivering van de keuze van het vehiculum als dit geen water is;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof met inbegrip van de toegediende volumes en het tijdstip van toediening;
- bijzonderheden omtrent voedsel en water (met inbegrip van type en herkomst van het voedsel, waterbron);
- motivering van de keuze van de beginndosis.

Resultaten :

- overzicht in tabelvorm van de gegevens met betrekking tot ieder dier, opgesplitst naar dosis en geslacht (het betreft de respons van de dieren die toxische verschijnselen, waaronder sterfte, vertoonden alsmede de aard, duur en hevigheid van de effecten);
- tijdsverloop van de eerste verschijnselen van intoxicatie en eventuele reversibiliteit van deze verschijnselen voor ieder dier afzonderlijk;
- resultaten van de necropsie en eventuele histopathologische bevindingen voor ieder dier afzonderlijk, indien beschikbaar.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

### 4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 423 van de OESO.

### BIJLAGE 1

#### TESTPROCEDURE

1. Zoals vermeld in punt 1.4.2.3 moet de beginndosis zó worden gekozen dat ten minste een gedeelte van de proefdieren sterft. De ter zake relevante informatie omvat onder meer :

- gegevens over fysisch-chemische eigenschappen;
- relaties tussen structuur en activiteit;
- alle gegevens van andere toxiciteitstesten, en
- het verwachte gebruik van de teststof.

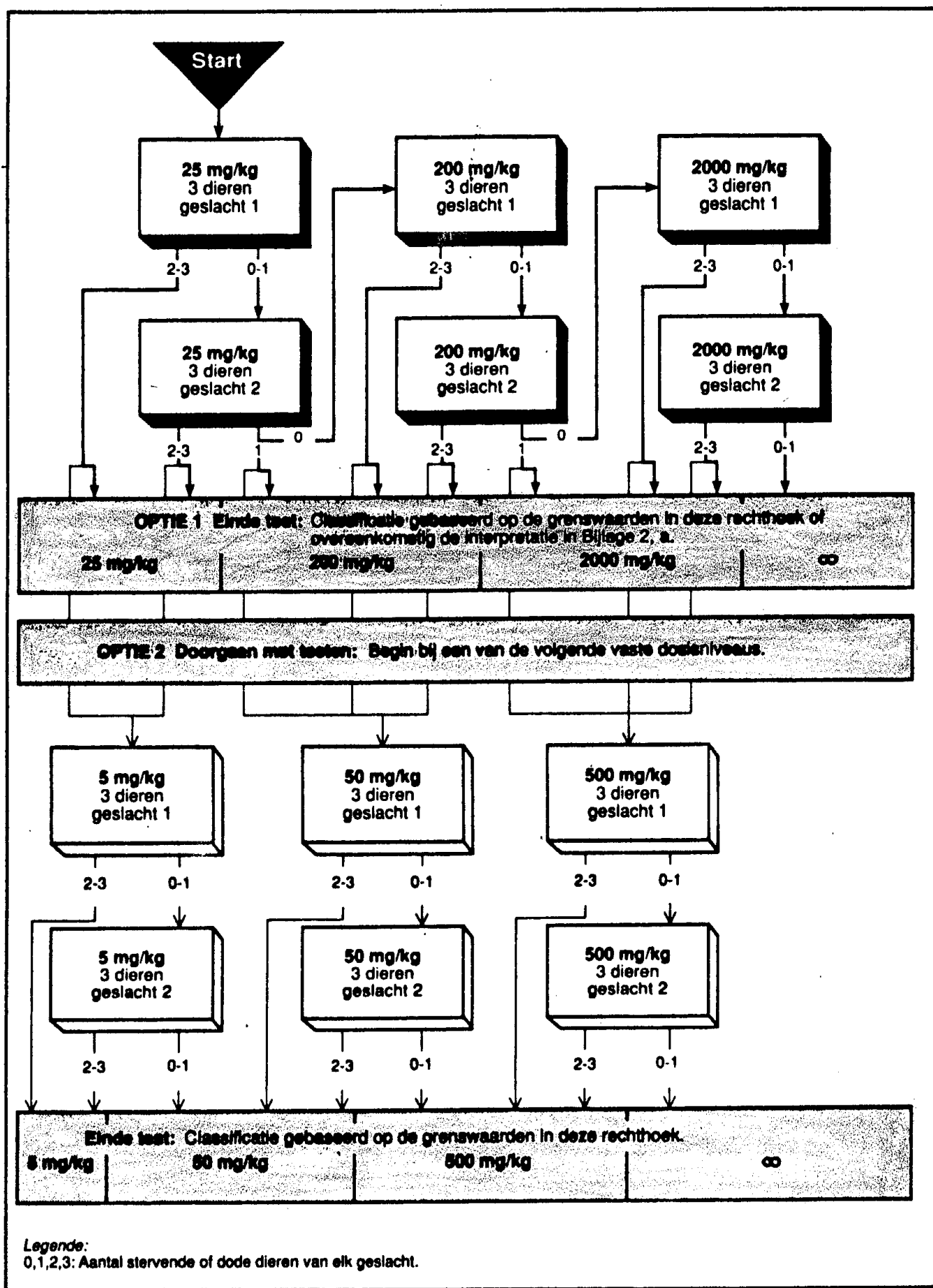
2. Voor iedere beginndosis geeft het bijbehorende testschema dat in deze bijlage is opgenomen, de te volgen procedure. Afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze afgemaakte dieren volgt de testprocedure de aangegeven pijlen.

3. Indien bij een beginndosis van 25 of 200 mg/kg lichaamsgewicht slechts één dier van het tweede geslacht sterft, leidt dit gewoonlijk tot niet verder testen. Als er echter geen toxische verschijnselen worden waargenomen bij de andere vijf dieren moet bij de autopsie aan de mogelijkheid gedacht worden dat de mortaliteit geen gevolg is van de teststof. In dat geval moet de test worden vervolgd met de eerstvolgende hogere dosis.

4. Indien bij een beginndosis van 2000 mg/kg lichaamsgewicht slechts één dier per geslacht sterft is de verwachtingswaarde van de LD<sub>50</sub> meer dan 2000 mg/kg lichaamsgewicht. Omdat dit echter een grensgeval is moet de respons van de andere twee dieren per geslacht nauwkeurig worden onderzocht. Het optreden van duidelijke toxische verschijnselen bij deze dieren kan aanleiding zijn tot een classificatie die overeenkomt met een LD<sub>50</sub>-waarde van 2000 mg/kg lichaamsgewicht of minder, of tot verder testen op hetzelfde niveau.

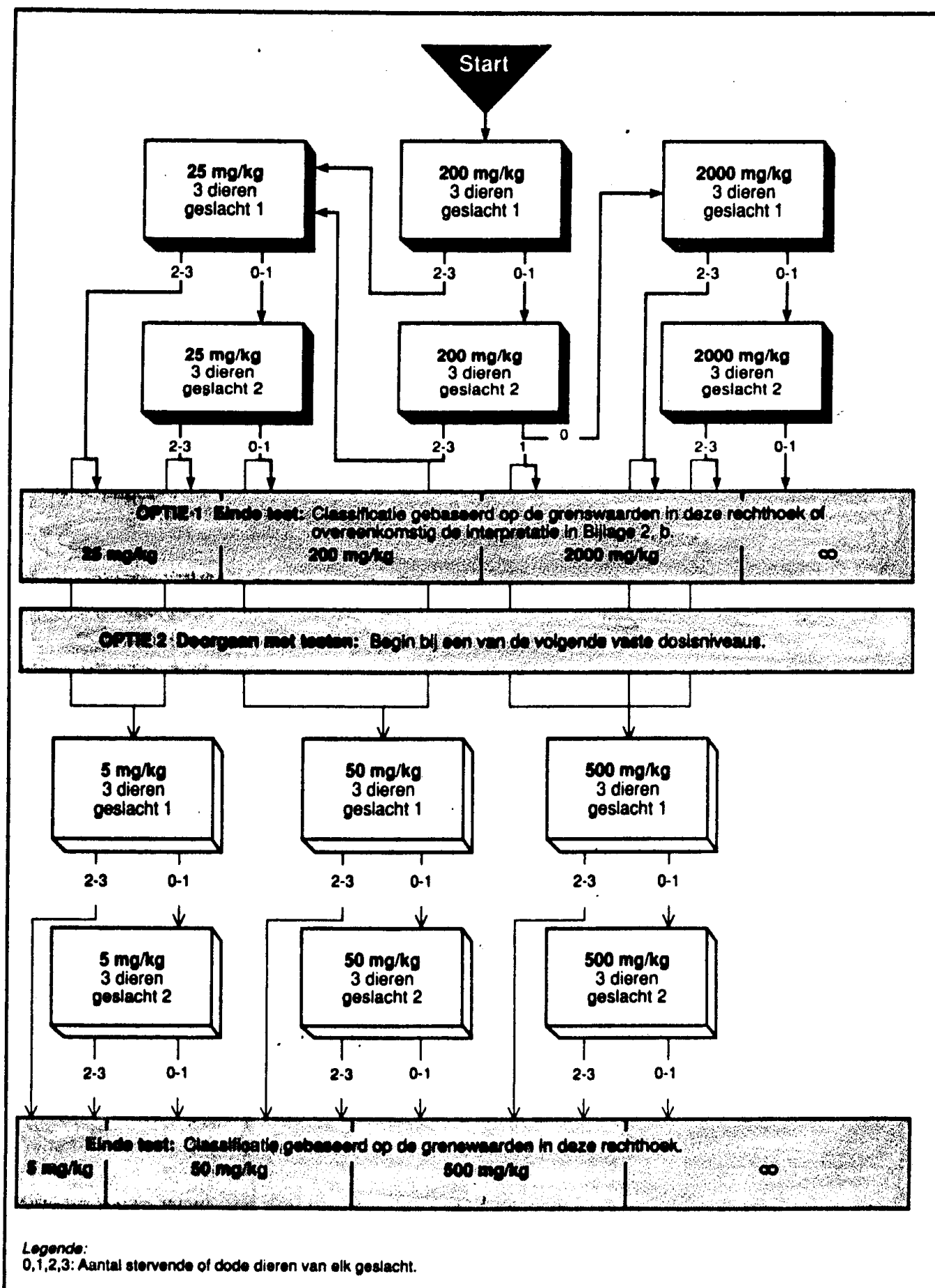
5. De procedure kan het verder testen op drie vaste dosisniveaus inhouden (optie 2). Deze optie kan worden gebruikt voor het kiezen van een alternatieve dosis op een gegeven beslispunt, of voor verder testen nadat de lopende test is afgesloten (optie 1). Bij optie 1 is de testprocedure aangegeven met vette pijlen, bij optie 2 met dunne pijlen.

a) Testprocedure voor een beginndosis van 25 mg/kg lichaamsgewicht

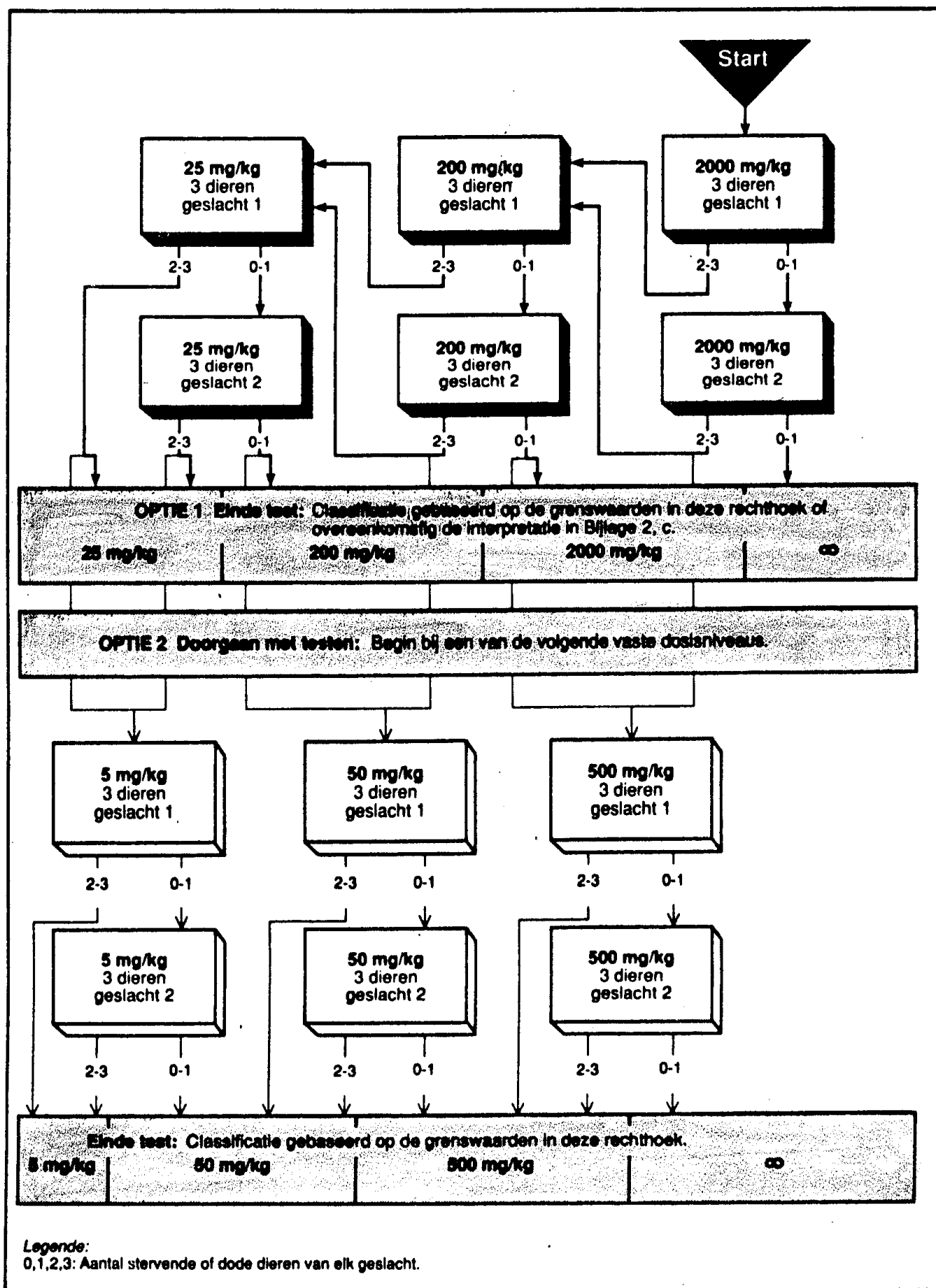




## b) Testprocedure voor een beginndosis van 200 mg/kg lichaamsgewicht



c) Testprocedure voor een begindosis van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht



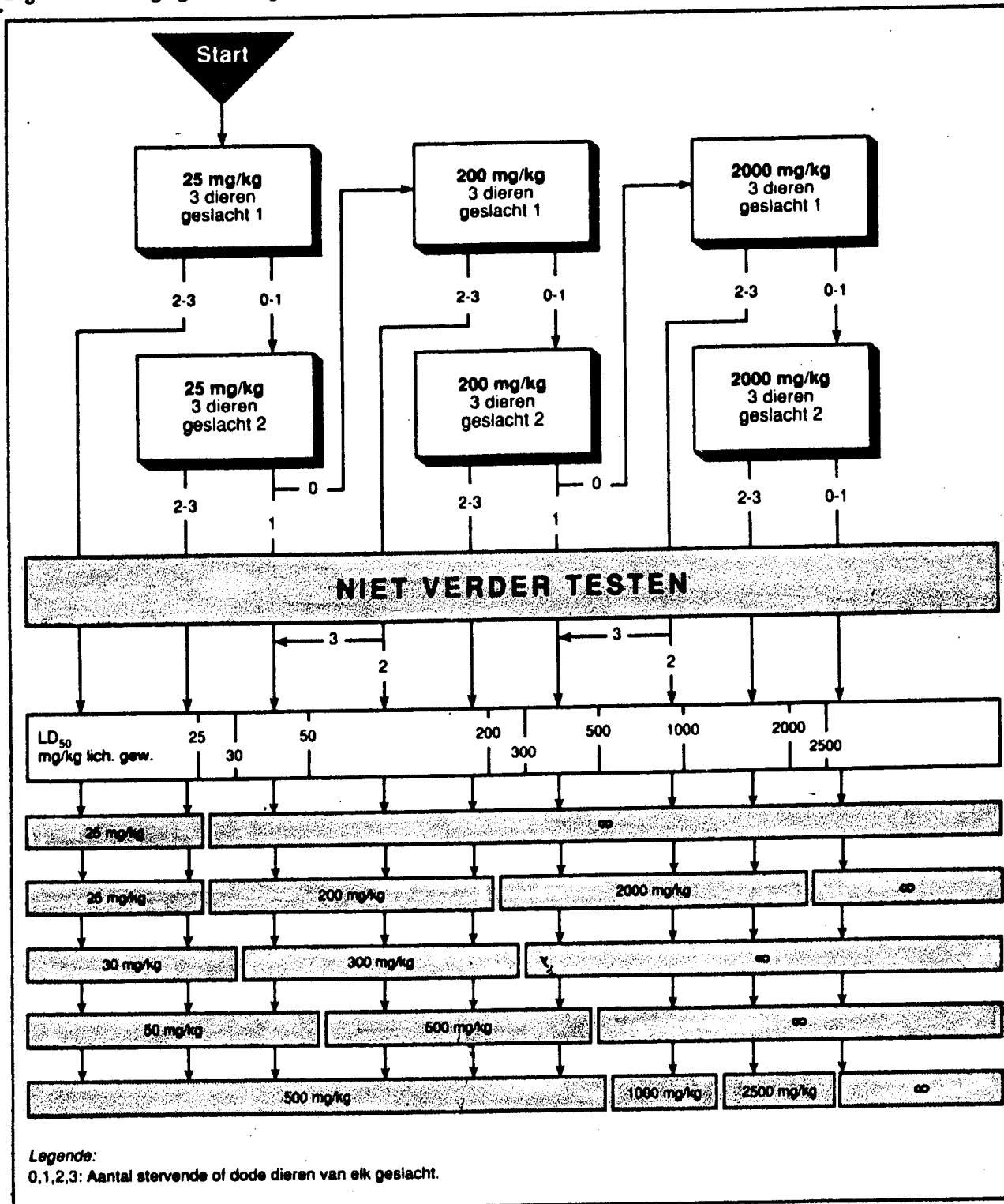
## BIJLAGE 2

## INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN BIJ HET TESTEN VOLGENS OPTIE 1

De grijze rechthoeken onder de rechthoek met „niet verder testen” in de schema's van deze bijlage geven de grenswaarden voor de classificatie weer. Bij het volgen van de testprocedure zoals aangeduid in optie 1, moet de juiste pijl verder naar beneden worden gevolgd tot deze de passende grijze rechthoek bereikt.

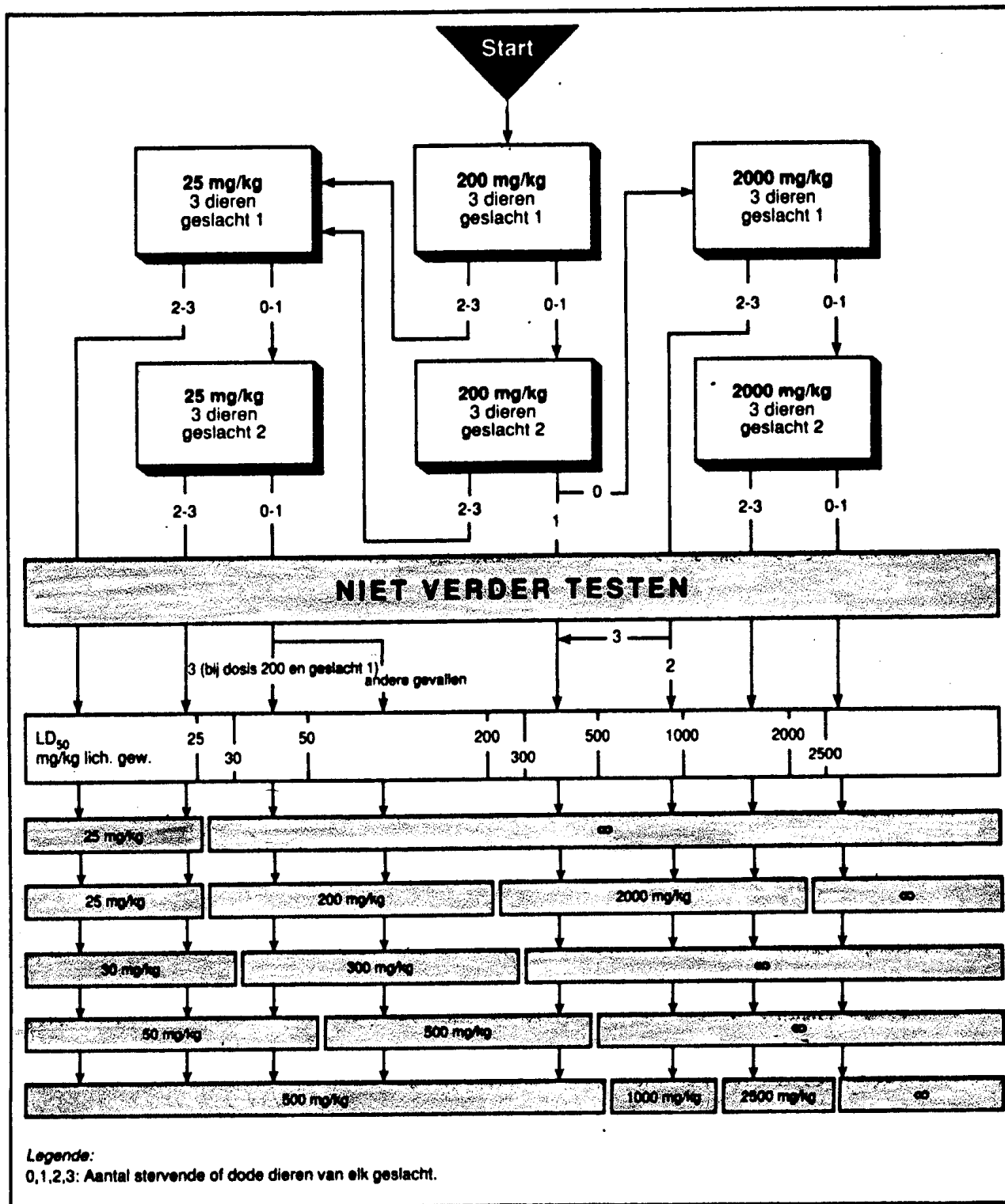
## a) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1

Begindosis: 25 mg/kg lichaamsgewicht



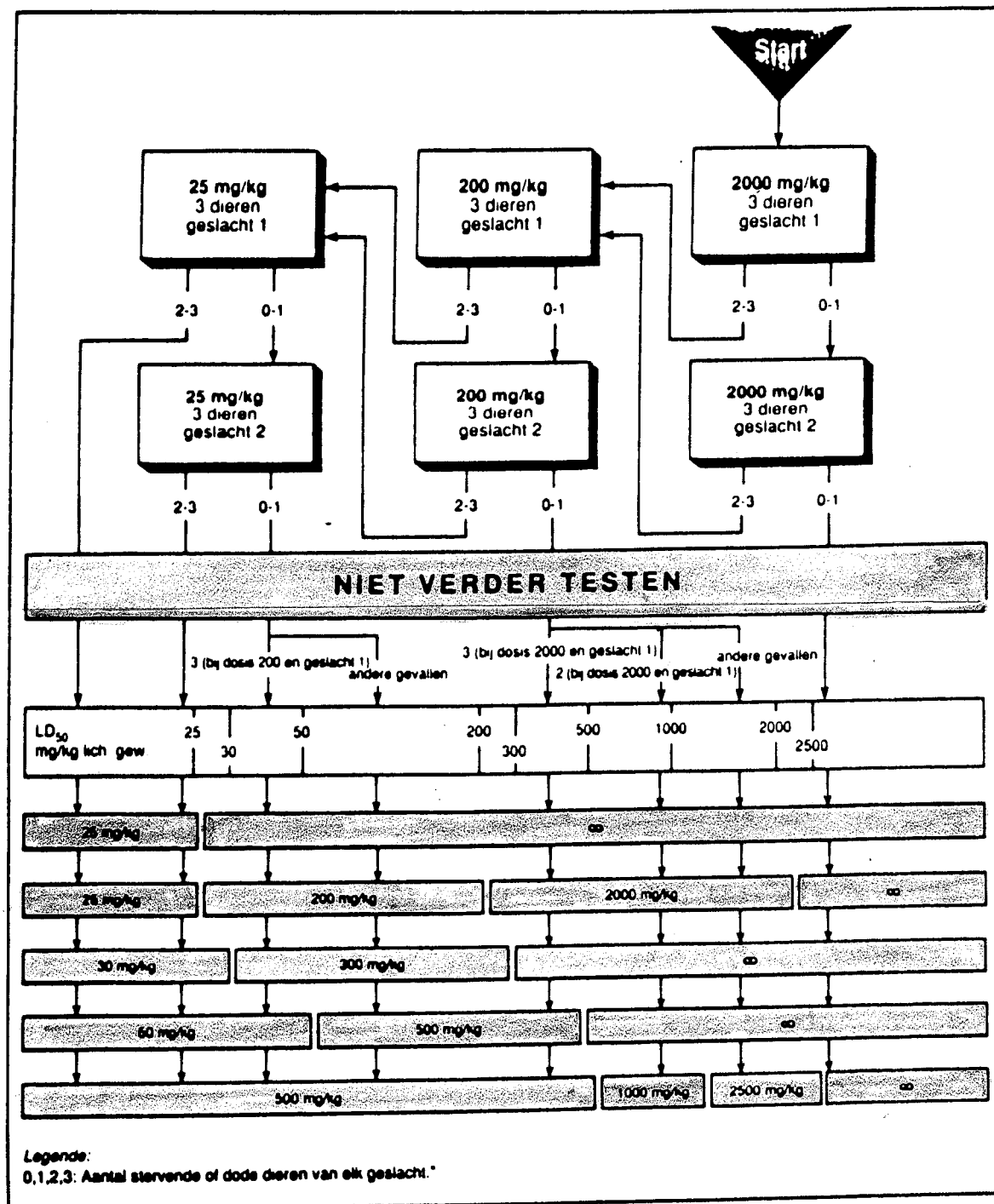
b) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1

Begindosis: 200 mg/kg lichaamsgewicht



## c) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1

Begin dosis: 2 000 mg/kg lichaamsgewicht



Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLADe Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMETDe Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

## Bijlage II C

## „B.6 SENSIBILISATIE VAN DE HUID

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

## Opmerkingen :

De gevoeligheid en het vermogen van een test om stoffen op te sporen met potentieel huidsensibiliserende eigenschappen bij de mens zijn belangrijk in een systeem voor de classificatie van toxische stoffen ten behoeve van de volksgezondheid.

Er bestaat géén universele testmethode waarmee alle stoffen die de menselijke huid kunnen sensibiliseren, adequaat kunnen worden geïdentificeerd en die voor alle stoffen toepasbaar is.

Bij de keuze van een test moet rekening worden gehouden met factoren zoals de fysische kenmerken van een stof, met inbegrip van het vermogen om de huid binnen te dringen.

Er zijn twee soorten tests ontwikkeld die gebruik maken van cavia's : het type waarbij een adjuvans wordt gebruikt en waarbij een verhoogde allergische reactie wordt opgewekt door het oplossen of suspenderen van de teststof in Freund's compleet adjuvans (FCA), en tests waarbij geen adjuvans wordt gebruikt.

Proeven met adjuvans voorspellen een eventueel huidsensibiliserend effect van een stof bij mensen wellicht nauwkeuriger dan methoden die geen gebruik maken van Freund's compleet adjuvans; zij verdienen dan ook de voorkeur.

De maximalisatietest met cavia's is een algemeen toegepaste test waarbij een adjuvans gebruikt wordt. Alhoewel verschillende andere methoden kunnen worden gebruikt om het huidsensibiliserend vermogen van een stof aan te tonen, wordt de maximalisatietest beschouwd als de adjuvanstechniek die de voorkeur heeft.

Voor veel soorten chemicaliën worden tests waarbij geen adjuvans wordt gebruikt (de Buehlertest heeft de voorkeur) als minder gevoelig beschouwd.

In bepaalde gevallen kunnen er goede redenen zijn om de Buehlertest te verkiezen, met lokale applicatie in plaats van intradermale injectie zoals in de maximalisatietest met cavia's. Voor het gebruik van de Buehlertest dient een wetenschappelijke motivering te worden gegeven.

De maximalisatietest met cavia's en de Buehlertest worden hier beschreven. Andere methoden mogen worden gebruikt op voorwaarde dat zij goed zijn gevalideerd en wetenschappelijk verantwoord zijn.

Indien een erkende screeningtest werd uitgevoerd en daarbij een positief resultaat werd geconstateerd, mag de teststof als een potentieel sensibiliserende stof worden aangemerkt en is het niet nodig ook nog een test met cavia's uit te voeren. Indien een dergelijke test evenwel tot een negatief resultaat heeft geleid, moet een caviatest worden uitgevoerd overeenkomstig de onder deze testmethode beschreven procedure.

Zie ook algemene inleiding deel B.

## 1.2. Definities

Huidsensibilisatie (allergische contactdermatitis) : is een door een immuunrespons veroorzaakte huidreactie op een stof. Bij mensen kan de reactie de vorm aannemen van jeuk, erytheem, oedeem (waterzucht), pukkels, blaasjes, blaren of een combinatie hiervan. Bij andere soorten kunnen de reacties anders zijn en kan alleen erytheem of oedeem optreden.

Inductieblootstelling : een experimentele blootstelling van een proefdier aan een teststof met de bedoeling een hypersensitieve toestand te induceren.

Inductieperiode : een periode van ten minste een week na de inductieblootstelling, gedurende welke een hypersensitieve toestand ontwikkeld kan worden.

Provocatieblootstelling : een experimentele blootstelling - na de inductieperiode - van een voorheen reeds blootgesteld proefdier aan een teststof, om vast te stellen of het dier een hypersensitieve reactie vertoont.

## 1.3. Referentiestoffen

De gevoeligheid en de betrouwbaarheid van de gebruikte technieken moet iedere zes maanden worden vastgesteld door het gebruik van stoffen waarvan bekend is dat ze lichte tot matige huidsensibiliserende eigenschappen hebben.

Bij een goed uitgevoerde test kan een reactie van ten minste 30 % worden verwacht bij een adjuvanstest en van ten minste 15 % bij een niet-adjuvanstest, bij gebruikmaking van zwakke/middelsterke sensibilisatoren.

De volgende stoffen genieten de voorkeur :

CASnummer	EINECSnummer	EINECS-naam	Triviale naam
101-86-0	202-983-3	$\alpha$ -hexylcinnamaldehyde	$\alpha$ -hexylcinnamaldehyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-thiol (mercaptobenzothiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	norcaïne

Er kunnen omstandigheden zijn waarbij andere referentiestoffen, die aan bovenstaande eisen voldoen, kunnen worden gebruikt; dit moet wetenschappelijk verantwoord worden.

## 1.4. Principe van de testmethode

De proefdieren worden eerst aan de teststof blootgesteld door een intradermale injectie en/of epidermale toepassing (inductieblootstelling). Na een rustperiode van 10 tot 14 dagen (inductieperiode), tijdens welke een immuunreactie op gang kan komen, worden de dieren blootgesteld aan een provocatiedosis. De omvang en intensiteit van de cutane reactie op de provocatieblootstelling bij de proefdieren wordt vergeleken met die van de controlegroep die een blanco behandeling ondergaat bij de industrie maar wél de provocatiedosis toegediend krijgt.

### 1.5. Beschrijving van de testmethoden

Als het nodig wordt geacht om de teststof te verwijderen, moet dit gebeuren met behulp van water of een ander geschikt oplosmiddel zonder dat de optredende reactie daardoor wordt beïnvloed of de opperhuid daardoor wordt geschonden.

#### 1.5.1. Maximalisatietest met cavia's (GPMT)

##### 1.5.1.1. Voorbereiding

Gezonde jonge volwassen albino cavia's worden ten minste 5 dagen voor het begin van de test geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden. Voor de test worden de dieren op aselechte wijze verdeeld over de behandelingsgroepen. Verwijdering van het haar gebeurt door middel van knippen, scheren of eventueel door chemische ontharing, afhankelijk van de gebruikte testmethode. Er dient op te worden gelet dat de huid niet beschadigd wordt. De dieren worden gewogen vóór het begin en aan het einde van de test.

##### 1.5.1.2. Proefomstandigheden

###### 1.5.1.2.1. Proefdieren

Er wordt gebruik gemaakt van stammen albino cavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

###### 1.5.1.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Minimaal 10 dieren worden gebruikt voor de behandelde groep en ten minste vijf voor de controlegroep. Als er minder dan 20 testcavia's en 10 controlecavia's worden gebruikt en het niet mogelijk is om vast te stellen of de teststof sensibiliserende eigenschappen heeft, wordt ten sterkste aangeraden om meer dieren te testen zodat een totaal van ten minste 20 testdieren en 10 controledieren wordt bereikt.

###### 1.5.1.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof die voor iedere inductie wordt gebruikt moet systemisch goed te verdragen zijn en gelijk zijn aan de hoogste concentratie die lichte tot matige huidirritatie veroorzaakt. De concentratie die voor de provocatieblootstelling wordt gebruikt moet de hoogste niet-irriterende dosis zijn. Indien noodzakelijk, kunnen de juiste concentraties worden vastgesteld aan de hand van een verkennende studie bij twee of drie proefdieren. Hierbij kan worden overwogen gebruik te maken van met FCA behandelde proefdieren.

##### 1.5.1.3. Procedure

###### 1.5.1.3.1. Inductie

###### Dag 0 - Testgroep

In de onthaarde schouderstreek worden drie paar injecties van 0,1 ml gegeven, zó dat van ieder paar er één aan elke zijde ligt :

Injectie 1 : een 1 :1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing;

Injectie 2 : de teststof in een geschikt vehiculum en in de geschikte concentratie;

Injectie 3 : de teststof in de gekozen concentratie, opgelost in een 1 :1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing.

Voor injectie 3 worden de in water oplosbare teststoffen in water opgelost vóór het mengen met FCA. In vet oplosbare of onoplosbare stoffen worden in FCA gesuspendeerd vóór het mengen met water. De uiteindelijke concentratie van de teststof moet gelijk zijn aan die welke voor injectie 2 wordt gebruikt.

De injecties 1 en 2 worden dicht bij elkaar en het dichtst bij het hoofd toegediend en injectie 3 aan de staartzijde van het testgebied.

###### Dag 0 - Controlegroep

Op dezelfde plaatsen als bij de proefdieren worden drie paar intradermale injecties van 0,1 ml toegediend :

Injectie 1 : een 1 :1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing;

Injectie 2 : het onverdunde vehiculum;

Injectie 3 : een 50 %-formulering (gewicht/volume) van het vehiculum in een 1 :1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing.

###### Dag 5-7 - Testgroep en controlegroep

Als de te onderzoeken stof geen huidirritatie geeft wordt het testgebied ongeveer 24 uur vóór de plaatselijke inductiebehandeling na knippen en/of scheren behandeld met 0,5 ml van een 10 %-formulering van natriumlaurylsulfaat in vaseline om een plaatselijke irritatie op te wekken.

###### Dag 6-8 - Testgroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Een filtreerpapier (2 cm × 4 cm) wordt gedrenkt met de teststof in een geschikt vehiculum en door middel van een occlusief verband gedurende 48 uur op het testgebied aangebracht. De keuze van het vehiculum moet worden verantwoord. Vaste stoffen worden verpulverd en in een geschikt vehiculum opgenomen. Vloeistoffen kunnen, zo nodig, onverdund worden aangebracht.

###### Dag 6-8 - Controlegroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Op dezelfde wijze als bij de testgroep wordt alleen het vehiculum aangebracht en gedurende 48 uur met het testgebied in contact gehouden door een occlusief verband.

##### 1.5.1.3.2. Provocatie

###### Dag 20-22 - Testgroep en controlegroep

Beide flanken van de dieren uit de testgroep en de controlegroep worden onthaard. Op één flank van de behandelde dieren wordt een gaasje of cupje met de teststof aangebracht en, waar nodig, een gaasje of cupje met alleen het vehiculum op de andere flank. Door middel van een occlusief verband wordt het gaasje gedurende 24 uur met de huid in contact gehouden.

###### 1.5.1.3.3. Observatie en scoring : testgroep en controlegroep

- Ongeveer 21 uur nadat het gaasje is verwijderd, wordt het provocatiegebied gereinigd en zo nodig zorgvuldig geknipt en/of geschoren en onthaard.

- Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 48 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.

- Ongeveer 24 uur na deze waarneming wordt een tweede waarneming gedaan (72 uur na aanvang provocatie) en eveneens geregistreerd.

Aangeraden wordt om de proefdieren en controledieren „blind” (d.w.z. zonder te weten of het test- of controledieren betreft) te scoren.

Als het nodig blijkt om opheldering te verkrijgen over de resultaten van de eerste provocatie kan na ongeveer een week een tweede provocatie (d.w.z. een herprovocatie) worden overwogen met, zo nodig, een nieuwe controlegroep. Herprovocatie kan ook plaatsvinden bij de oorspronkelijke controlegroep.

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen, waaronder ook systemische reacties, die het gevolg zijn van de inductie- en provocatieprocedures moeten worden geobserveerd en geregistreerd volgens de scoreschaal van Magnusson/Kligman (zie aanhangsel). Andere technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden toegepast om klaarheid te verschaffen omtrent onduidelijke reacties.

#### 1.5.2. Buehlertest

##### 1.5.2.1. Voorbereiding

Gezonde jonge volwassen albino cavia's worden ten minste 5 dagen voor het begin van de test geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden. Voor de test worden de dieren op aselechte wijze verdeeld over de behandelingsgroepen. Verwijdering van het haar gebeurt door middel van knippen, scheren of eventueel door chemische ontharing, afhankelijk van de gebruikte testmethode. Er dient op te worden gelet dat de huid niet beschadigd wordt. De dieren worden gewogen vóór het begin en aan het eind van de test.

##### 1.5.2.2. Proefomstandigheden

###### 1.5.2.2.1. Proefdieren

Er wordt gebruik gemaakt van stammen albino cavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

###### 1.5.2.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Voor de behandelde groep worden minimaal 20 dieren gebruikt en voor de controlegroep ten minste 10.

###### 1.5.2.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof die voor iedere inductie wordt gebruikt moet de hoogste zijn die lichte maar geen excessieve huidirritatie geeft. De concentratie die voor de provocatieblootstelling wordt gebruikt moet de hoogste niet-irriterende dosis zijn. Indien noodzakelijk, kunnen de juiste concentraties worden vastgesteld aan de hand van een verkennende studie bij twee of drie proefdieren.

Als de teststoffen in water oplosbaar zijn verdient water of een verdunde, niet-irriterende oplossing van een surfactans de voorkeur als vehiculum. Bij andere teststoffen wordt de voorkeur gegeven aan 80 % alcohol/water bij de inductie en aan aceton bij de provocatie.

##### 1.5.2.3. Procedure

###### 1.5.2.3.1. Inductie

###### Dag 0 - Testgroep

Eén flank wordt onthaard. Het testgaasje moet doordrenkt zijn met de teststof in een geschikt vehiculum (de keuze van het vehiculum moet worden verantwoord; vloeibare teststoffen kunnen eventueel onverdund worden aangebracht). Het testgaasje wordt op het testgebied aangebracht en daarmee gedurende 6 uur in contact gehouden door een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband.

Het testgaasje moet afdekkend zijn. Er kan gebruik worden gemaakt van een rond of vierkant wattenschijfje met een oppervlakte van ongeveer 4-6 cm<sup>2</sup>. Om een goede afdekking te garanderen kan een passende voorziening worden gebruikt waardoor de bewegingsvrijheid van de dieren wordt beperkt. Bij gebruik van een zwachtel alléén kan herhaalde blootstelling nodig zijn.

###### Dag 0 - Controlegroep

Een flank wordt onthaard. Op dezelfde wijze als bij de testgroep wordt nu alleen het vehiculum aangebracht. Het testgaasje wordt op het testgebied aangebracht en daarmee gedurende 6 uur in contact gehouden door een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband. Als kan worden aangetoond dat een blanco controlegroep niet nodig is, kunnen niet-behandelde dieren als controlegroep worden gebruikt.

###### Dag 6-8 en 13-15 - Testgroep en controlegroep

Hetzelfde testoppervlak van dezelfde flank ondergaat, na eventuele verwijdering van de beharing, op dag 6-8 en nogmaals op dag 13-15 dezelfde blootstelling als op dag 0.

###### 1.5.2.3.2. Provocatie

###### Dag 27-29 - Testgroep en controlegroep

De onbehandelde flank van de test- en controledieren wordt onthaard. Een occlusieve pleister of een cupje met de juiste hoeveelheid teststof in de maximale niet-irriterende concentratie, wordt aangebracht op het achterste deel van de flank van de testdieren en van de controledieren.

Indien dit wenselijk is wordt op het voorste gedeelte van de onbehandelde flank van zowel de testdieren als de controledieren een occlusieve pleister of een cupje met alleen het vehiculum aangebracht. De pleisters of cupjes worden gedurende 6 uur op hun plaats gehouden door een geschikt verband.

###### 1.5.2.3.3. Observatie en scoring

- Ongeveer 21 uur nadat de pleister is verwijderd wordt het provocatiegebied onthaard.

- Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 30 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.

- Ongeveer 24 uur na de 30-uurswaarneming wordt een tweede waarneming van de huidreacties gedaan (ongeveer 54 uur na aanvang van de provocatie) en worden de resultaten weer geregistreerd.

Aangeraden wordt om de testdieren en controledieren „blind" (d.w.z. zonder te weten of het test- of controledieren betreft) te scoren.

Als het nodig blijkt om opheldering te verkrijgen over de resultaten van de eerste provocatie kan na ongeveer een week een tweede provocatie (d.w.z. een herprovocatie) overwogen worden met, zo nodig, een nieuwe controlegroep. Herprovocatie kan ook plaatsvinden bij de oorspronkelijke controlegroep.

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen, waaronder ook systemische reacties, die het gevolg zijn van de inductie- en provocatieprocedures moeten worden geobserveerd en geregistreerd volgens de schaal van Magnusson/Kligman (zie aanhangsel). Andere technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden toegepast om klaarheid te verschaffen omtrent onduidelijke reacties.

## 2. GEDEVENS (GPMT EN BUEHLERTEST)

Alle gegevens moeten in tabelvorm worden samengevat, waarbij voor ieder dier de bij iedere controle waargenomen huidreacties worden vermeld.

## 3. RAPPORTAGE (GPMT EN BUEHLERTEST)

Wanneer vóór de proef met cavia's een screeningstest wordt uitgevoerd, moet een beschrijving van of verwijzing naar de test in kwestie (bij voorbeeld de Local Lymph Node Assay (LLNA) of de Mouse Ear Swelling Test (MEST)) worden gegeven en moeten bijzonderheden over de procedure worden verstrekt. Verder moeten de resultaten worden gerapporteerd die met de teststof en de referentiestof zijn verkregen.



Verslag van de proefnemingen (GPMT en Buehlertest)

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

Proefdieren :

- gebruikte caviastam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, behuizing, dieet, enz.;
- gewicht van ieder dier bij het begin van de proefneming.

Proefomstandigheden :

- gebruikte techniek bij het prepareren van het te behandelen oppervlak;
- bijzonderheden met betrekking tot het pleister- of gaasmateriaal en de wijze van aanbrengen;
- resultaten van de voorstudie met conclusies over de inductie- en provocatieconcentraties die bij de test moeten worden gebruikt;
- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, het toedienen en het verwijderen hiervan;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- concentraties van vehiculum en teststof die gebruikt zijn bij de inductie en de provocatie en de totale hoeveelheid teststof die gebruikt is voor inductie en provocatie.

Resultaten :

- een samenvatting van de resultaten van de meest recente gevoeligheids- en betrouwbaarheidscontrole (zie 1.3), met inbegrip van informatie over gebruikte teststof, concentratie en vehiculum;
- resultaten voor ieder dier afzonderlijk, inclusief scores;
- beschrijving van de aard en de intensiteit van de waargenomen effecten;
- eventuele histopathologische bevindingen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 406 van de OESO

Aanhangsel

TABEL :

Magnusson/Kligman-scoreschaal voor de evaluatie van reacties op de provocatiepleister

0 = geen zichtbare verandering

1 = discontinu of vlekkelig erytheem

2 = matig en aaneengesloten erytheem

3 = ernstig erytheem met zwelling"

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

#### Bijlage II D

„B.7 TOXICITEIT (ORAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

##### 1. METHODE

###### 1.1 Inleiding

Zie algemene inleiding deel B

###### 1.2. Definities

Zie algemene inleiding deel B

###### 1.3. Principe van de testmethode

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks oraal-toegediend aan verschillende groepen proefdieren, in trapsgewijs stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks zorgvuldig geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden afgemaakt, wordt een necropsie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn worden afgemaakt en ook hierop wordt een necropsie verricht.

Bij deze methode ligt het accent meer op neurologische effecten als specifiek eindpunt. Benadrukt moet worden dat het noodzakelijk is de dieren zorgvuldig klinisch te observeren om zoveel mogelijk informatie te verzamelen. Deze methode moet het mogelijk maken potentieel neurotoxische chemicaliën te identificeren, die in dit opzicht nader verdienen te worden onderzocht. Voorts kan deze methode aanwijzingen geven over immunologische effecten en toxiciteit voor de voortplantingsorganen.

###### 1.4. Beschrijving van de testmethode

###### 1.4.1. Voorbereidingen

Gezonde jonge volwassen dieren worden op aselechte wijze verdeeld over de controlegroep en de testgroepen. De kooien moeten op zodanige wijze worden opgesteld dat eventuele plaatseffecten geminimaliseerd worden. De dieren worden individueel geïdentificeerd en worden vóór het onderzoek ten minste 5 dagen in hun kooi gehouden ter acclimatisatie aan de laboratoriumomstandigheden.

De teststof wordt toegediend via een maagsonde of via de voeding of het drinkwater. De wijze van toedienen is afhankelijk van het doel van het onderzoek en de fysisch/chemische eigenschappen van de teststof.

Zo nodig moet de teststof worden opgelost of gesuspendeerd in een geschikt vehiculum. Het verdient aanbeveling om zo mogelijk een waterige oplossing of suspensie te gebruiken. Als dit niet mogelijk is kan voor een oplossing of suspensie in olie (bij voorbeeld maïsolie) of in laatste instantie voor een oplossing in een ander medium worden gekozen. Van andere media dan water moeten de toxicologische karakteristieken bekend zijn. De stabiliteit van de teststof in het vehiculum moet worden vastgesteld.

#### 1.4.2. Proefomstandigheden

##### 1.4.2.1. Proefdieren

De voorkeur wordt gegeven aan ratten, hoewel andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van rattenstammen die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn. De toediening moet zo snel mogelijk na het verspenen beginnen en in ieder geval vóór de dieren negen weken oud zijn.

Bij het begin van de studie moet de gewichtsvariatie van de dieren minimaal zijn en mag het gewicht van ieder dier niet meer dan 20 % afwijken van het gemiddelde gewicht.

Als een proef met herhaalde orale toediening wordt uitgevoerd als inleiding op een studie van langere duur, moeten de dieren in beide studies bij voorkeur tot dezelfde stam behoren en dezelfde oorsprong hebben.

##### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

Op ieder dosisniveau moeten ten minste 10 dieren (5 mannetjes en 5 wijfjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is sommige dieren tussentijds te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat volgens de proefopzet tussentijds zal worden gedood.

Daarnaast kan een satellietgroep van 10 dieren (5 per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau en vervolgens gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van 10 controledieren (5 per geslacht) gebruikt.

##### 1.4.2.3. Dosisniveaus

In het algemeen zijn drie testgroepen en een controlegroep vereist. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren van de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de testgroep. Indien een vehiculum wordt gebruikt bij het toedienen van de teststof moet de controlegroep het grootste gebruikte volume van dat vehiculum toegediend krijgen.

Als uit andere gegevens kan worden geconcludeerd dat bij een dagelijkse dosis van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht geen effecten worden verwacht, kan een limiettest worden uitgevoerd. Als er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, kan een studie worden uitgevoerd om de orde van grootte van de te gebruiken doses te helpen bepalen.

De dosisniveaus moeten worden gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica van de teststof en verwante stoffen. Het hoogste dosisniveau moet zó gekozen worden dat toxische effecten optreden, maar geen sterfte of ernstig lijden. Verder moet een dalende reeks doses worden gekozen met het oog op het vaststellen van een eventuele dosis-responsrelatie en het niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau. Dosisniveaus die telkens een factor 2 à 4 verschillen zijn vaak optimaal. Toevoeging van een vierde testgroep is vaak te prefereren boven een zeer groot niveauverschil (bij voorbeeld een factor 10 of meer) tussen de opvolgende doses.

Indien de stoffen via de voeding of het drinkwater worden toegediend is het van belang erop te letten dat de betrokken hoeveelheden teststof de normale voedings- of waterbalans niet verstoren. Als de teststof via de voeding wordt toegediend kan een vaste concentratie in de voeding (ppm) worden gebruikt of een constant dosisniveau in termen van het lichaamsgewicht van het dier. Aangegeven moet worden welk alternatief is gebruikt. Bij gebruik van een maagsonde voor het toedienen van de teststof moet de dosis iedere dag op hetzelfde tijdstip worden gegeven en zo nodig worden aangepast om een constant dosisniveau per kg lichaamsgewicht te handhaven.

Als een studie met herhaalde toediening wordt gebruikt als voorloper van een studie op lange termijn moet bij beide studies soortgelijk voedsel worden verstrekt.

##### 1.4.2.4. Limiettest

Als volgens de hier beschreven procedures een proef wordt uitgevoerd met een dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht per dag - of, in het geval van toediening via het voedsel of het drinkwater, het equivalente percentage in het voedsel of het water (berekend overeenkomstig het lichaamsgewicht) - en er geen waarneembare toxische effecten optreden, en deze ook niet kunnen worden verwacht op grond van gegevens betreffende stoffen met verwante structuur, is het niet noodzakelijk een volledige proef met drie dosisniveaus te doen. De limiettest is van toepassing tenzij het niveau waarop de mens kan worden blootgesteld, testen met een hogere dosis noodzakelijk maakt.

##### 1.4.2.5. Observatieperiode

De dieren moeten 28 dagen worden geobserveerd. Dieren uit een satellietgroep die bestemd is voor vervolgwarnemingen moeten daarna nog ten minste 14 dagen zonder behandeling worden geobserveerd om de persistentie van de toxische effecten c.q. het herstel alsmede het eventuele optreden van vertraagde toxiciteit te kunnen waarnemen.

#### 1.4.3. Procedure

De dieren krijgen de teststof gedurende 28 dagen zeven maal per week toegediend. Indien de teststof vijf maal per week wordt toegediend moet dit worden verantwoord. Als de teststof wordt toegediend via een maagsonde, moet dit in één keer gebeuren onder gebruikmaking van een maagcatheter of een geschikte intubatiecanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die per keer kan worden toegediend hangt af van de grootte van het dier. Het volume mag niet meer zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve als er een waterige oplossing wordt gebruikt, in welk geval 2 ml/100 g lichaamsgewicht is toegestaan. Met uitzondering van irriterende of bijtende stoffen, die gewoonlijk heviger effecten veroorzaken bij hogere concentraties, moet de variabiliteit van het testvolume worden geminimaliseerd door aanpassing van de concentratie, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante testvolume wordt gebruikt.

##### 1.4.3.1. Algemene observaties

Algemene klinische waarnemingen moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met in achtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. De gezondheidstoestand van de dieren moet worden geregistreerd. De dieren moeten ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Stervende dieren en dieren die in grote nood verkeren of hevige pijn lijden moeten worden verwijderd, op humane wijze afgemaakt en aan een necropsie onderworpen.

Alle dieren worden éénmaal voor het begin van de proef nauwkeurig klinisch onderzocht (om intra-individuele vergelijking mogelijk te maken) en vervolgens ten minste eenmaal per week. Dit onderzoek moet buiten de kooi op een vaste onderzoekplaats en bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip uitgevoerd worden. De resultaten moeten zorgvuldig worden geregistreerd, waarbij bij voorkeur gebruik wordt gemaakt van scoringsystemen die expliciet door het testlaboratorium zijn vastgelegd. Er moet zoveel mogelijk worden gezorgd dat variaties in de proefomstandigheden minimaal zijn en dat de waarnemers niet weten welke behandeling een gegeven dier heeft ondergaan. Tekenen waarop moet worden gelet zijn onder meer (maar niet alleen) : veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte of een ongewoon ademhalingspatroon. Veranderingen in gang, houding en respons op vasthouden en ook het uitvoeren van clonische of tonische bewegingen, stereotypen (bij voorbeeld excessief poetsgedrag, ronddraaien) of afwijkend gedrag (bij voorbeeld zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden geregistreerd.

Gedurende de vierde week van de blootstelling moet de sensorische reactiviteit op stimuli van verschillende aard (auditief, visueel en proprioceptief) worden bepaald en moet een bepaling van de grijpkracht en de motorische activiteit plaatsvinden. Nadere bijzonderheden omtrent de te volgen procedures zijn te vinden in de literatuur (zie algemene inleiding deel B).

Als de studie wordt verricht als voorstudie op een daaropvolgende subchronische (90-daagse) studie, kunnen functionele observaties in de vierde week achterwege worden gelaten. In dat geval moeten de functionele observaties in het bedoelde vervolgonderzoek plaatsvinden. Daar staat echter tegenover dat de beschikbaarheid van gegevens betreffende functionele prestaties uit de studie met herhaalde toediening, de keuze van de dosisniveaus voor de daaropvolgende subchronische studie ten goede kan komen.

Bij wijze van uitzondering kunnen functionele observaties ook achterwege blijven bij groepen die verder dermate sterke toxiciteitseffecten vertonen dat het testen van de functionele prestaties daardoor ernstig wordt gehinderd.

#### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht en voedsel/waterconsumptie

Ieder dier moet ten minste eenmaal per week worden gewogen. De opgenomen hoeveelheid voedsel en water moet minstens eenmaal per week worden gemeten. Indien de teststof via het drinkwater wordt toegediend moet de waterconsumptie ook minstens eenmaal per week worden gemeten.

#### 1.4.3.3. Hematologie

Aan het eind van de testperiode moeten de volgende onderzoeken worden verricht : bepaling van de hematocriet en de hemoglobineconcentratie, erythrocytelling, totale en differentiële leukocyten telling, plaatjestelling en bepaling van de stollingsstijd en het stollingsvermogen.

De bloedmonsters worden genomen net vóór of tijdens het afmaken van de dieren; er dient te worden genoteerd uit welk lichaamsdeel. De monsters moeten onder de juiste omstandigheden worden bewaard.

#### 1.4.3.4. Klinische biochemie

Om belangrijke toxische effecten op de weefsels en met name op de nieren en de lever te onderzoeken, moet klinisch-biochemisch onderzoek verricht worden op bloedmonsters van alle dieren, met uitzondering van de dieren die stervend zijn aangetroffen of die voortijdig zijn afgemaakt. Deze monsters moeten juist vóór het afmaken of als onderdeel van de procedure hiervoor worden genomen. Het verdient aanbeveling om de dieren vóór het bloedafnemen een nacht te laten vasten (1). Onderzoek van plasma en serum moet omvatten : natrium, kalium, glucose, totaal cholesterol, ureum, creatinine, totaal proteïne en albumine, ten minste twee enzymen die een indicatie geven van hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, alkalische fosfatase, gamma-glutamyltranspeptidase en sorbitoldehydrogenase). Bepaling van andere enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en galzuren kan onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie geven.

De volgende facultatieve urineanalysebepalingen kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek worden uitgevoerd op basis van een volgens een vast tijdschema verlopende urinemonsterneming : aspect, hoeveelheid, osmolaliteit of dichtheid, pH, proteïnen, glucose en bloed/bloedcellen.

Verder moet een onderzoek naar serummarkers van algemene weefselschade overwogen worden. Andere onderzoeken die moeten worden uitgevoerd als van de teststof bekend is, of vermoed wordt, dat zij de desbetreffende metabolische profielen beïnvloedt, zijn : calcium, fosfaat, triglyceriden (nuchterwaarde), specifieke hormonen, methemoglobine en cholesterinase. Deze moeten in het geval van teststoffen uit bepaalde klassen c.q. van geval tot geval worden geïdentificeerd.

In het algemeen is een flexibele aanpak noodzakelijk, afhankelijk van het soort proefdieren en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

Als bij gebrek aan referentiegegevens geen adequate vergelijkingsbasis voorhanden is, moet worden overwogen om hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen vóór met de toediening wordt begonnen.

#### 1.4.3.5. Macroscopische necropsie

Alle proefdieren uit het onderzoek moeten worden onderworpen aan een volledige, gedetailleerde macroscopische necropsie, die onder meer een zorgvuldig onderzoek van het uitwendig oppervlak van het lichaam, alle lichaamsopeningen en de hersen-, borst- en buikholte en de organen daarin omvat. De lever, nieren, bijnieren, testes, bijballen, zwezerik, milt, hersenen en het hart van alle dieren moeten worden ontdaan van alle aanhangend weefsel en zo snel mogelijk na dissectie in natte toestand worden gewogen om uitdroging te voorkomen.

De volgende weefsels moeten worden geconserveerd in het fixermiddel dat zowel voor het type weefsel als het voorgenomen histopathologische onderzoek het meest geschikt is : alle grotere laesies, hersenen (representatieve delen waaronder de grote en kleine hersenen en de brug van Varol), ruggemerg, maag, dunne en dikke darm met plaques van Peyer, lever, nieren, bijnieren, milt, hart, zwezerik, schildklier, luchtpijp en longen (conserveren door opblazen met een fixatief en dan onderdempelen), geslachtsklieren, secundaire geslachtsorganen (bij voorbeeld uterus, prostaat), urineblaas, lymfeklieren (bij voorkeur een klier die in de route van de toediening gelegen is en één die daar ver van verwijderd is, om rekening te houden met systemische effecten), perifere zenuwen (grote heupzenuw of scheenbeen-zenuw), bij voorkeur dicht bij de spier, en een coupe van het beenmerg (of, in plaats daarvan, een direct op een objectglaasje aangebracht stukje opgezogen beenmerg). De resultaten van het klinische onderzoek en van andere onderzoeken kunnen aanleiding zijn om nog andere weefsels te bestuderen. Ook moeten alle andere organen worden geconserveerd die, voor zover bekend is van de eigenschappen van de teststof, waarschijnlijk als doelorgaan fungeren.

#### 1.4.3.6. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de met de hoogste dosisniveau behandelde groep en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de geconserveerde organen en weefsels. Als met de behandeling samenhangende veranderingen worden geconstateerd in de groep met de hoogste dosering, moet het onderzoek worden uitgebreid tot de dieren van alle andere doseringsgroepen.

Alle grotere laesies moeten worden onderzocht.

Indien gebruik wordt gemaakt van een satellietgroep moet ook daarbij histopathologisch onderzoek worden verricht op alle organen die in de behandelde groep effecten vertonen.

## 2. GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere proefgroep laten zien : het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om ethische redenen is afgemaakt en het tijdstip waarop, het aantal dat verschijnselen van toxiciteit vertoonde, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen, waaronder het tijdstip van aanvang, de duur en ernst van de verschijnselen, het aantal dieren dat laesies vertoonde, het soort laesie en het percentage dieren dat elk soort laesie vertoonde.

Zo mogelijk moeten de numerieke resultaten met behulp van een geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methode worden geëvalueerd. De gebruikte methoden moeten reeds bij het ontwerpen van de studie worden gekozen.

## 3. RAPPORTAGE

Verslag van het onderzoek

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

Proefdieren :

- diersoort/stam;
- Aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, behuizing, voeding enz.;
- individueel gewicht als bepaald aan het begin van de test, daarna met wekelijkse intervallen en aan het einde van de test.

Proefomstandigheden :

- motivering van de keuze van het vehiculum als dit geen water was;
- motivering voor de keuze van het dosisniveau;
- bijzonderheden over de bereiding van het teststof/voedselpreparaat, bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- bijzonderheden over het toedienen van de teststof;
- conversie van teststofconcentratie in voedsel/drinkwater (ppm) naar actuele dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- bijzonderheden over het soort voedsel en het drinkwater.

Resultaten :

- lichaamsgewicht/veranderingen hierin;
- voedsel- en waterconsumptie, indien van toepassing;
- gegevens over de toxische respons, waaronder tekenen van toxiciteit, uitgesplitst per geslacht en dosisniveau;
- aard, ernst en duur van de klinische verschijnselen (al of niet reversibel);
- sensorische activiteit, grijpkracht en motorische activiteit;
- hematologisch onderzoek (met relevante vergelijkingsbasis);
- klinisch-biochemisch onderzoek (met relevante vergelijkingsbasis);
- lichaamsgewicht bij het afmaken en gegevens over het gewicht van de organen;
- resultaten van de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- absorptiegegevens, indien beschikbaar;
- statistische verwerking van de gegevens, waar relevant.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies

## 4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 407 van de OESO. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

—  
Nota

(1) Voor een aantal bepalingen op serum en plasma, en met name voor de glucosebepaling, is een nacht vasten vóór de bloedafname wenselijk. De voornaamste reden is dat de toegenomen variabiliteit die onvermijdelijk het gevolg is van niet-vasten, subtiele effecten maskeert en de interpretatie bemoeilijkt. Daar staat tegenover dat een nacht vasten van invloed kan zijn op het algemene metabolisme van de dieren en dat dit in het bijzonder bij voedingstudies, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoort. Als men de dieren een nacht laat vasten moeten de klinisch-biochemische bepalingen verricht worden na de functionele observaties in week 4 van de studie.

## Bijlage II E

## „B.37 VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN NA ACUTE BLOOTSTELLING

## 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische effecten van stoffen is het van belang rekening te houden met het vermogen van sommige soorten stoffen om specifieke typen neurotoxiciteit te veroorzaken die niet met andere toxiciteitstesten kunnen worden aangetoond. Bij sommige organische fosforverbindingen is waargenomen dat vertraagde neurotoxiciteit optreedt; deze stoffen moeten worden beschouwd als kandidaten voor evaluatie.

Door screening in vitro kan worden nagegaan welke stoffen vertraagde polyneuropathie kunnen veroorzaken; negatieve uitkomsten vormen echter geen bewijs dat de teststof niet neurotoxisch is.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

## 1.2. Definities

Organische fosforverbindingen omvatten ongeladen organische esters, thioesters of anhydriden van organische fosforzuren, organische fosforzuren of organische fosforamidezuren of van verwante fosforthiozuren, fosforthiozuren of fosforthioamidezuren, of andere stoffen die de vertraagde neurotoxiciteit kunnen veroorzaken die soms bij stoffen uit deze klasse wordt waargenomen.

Vertraagde neurotoxiciteit is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieën in het ruggemerg en perifere zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

## 1.3. Referentiestoffen

Een referentiestof kan worden getest met een positieve controlegroep om aan te tonen dat de respons van geteste diersoorten onder laboratoriumomstandigheden niet significant is veranderd.

Een voorbeeld van een vaak toegepaste neurotoxicum is tri-o-tolylfosfaat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-naam : fosforzuur, tris(2,methylfenyl)ester), ook bekend als tri-o-kresylfosfaat.

## 1.4. Principe van de testmethode

De teststof wordt oraal in één enkele dosis toegediend aan hennen die, zo nodig, beschermd zijn tegen acute cholinerge effecten. De dieren worden gedurende 21 dagen geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlamingsverschijnselen. Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Eenentwintig dagen na de toediening worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

## 1.5. Beschrijving van de testmethode

## 1.5.1. Voorbereidingen

Gezonde jonge volwassen hennen die geen storende virusinfecties of medicatie hebben en die een normale gang vertonen worden aselekt verdeeld over behandelde en controlegroepen en ten minste gedurende vijf dagen voor de aanvang van het onderzoek geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden.

De kooien of verblijven moeten zó ruim zijn, dat de hennen vrij kunnen bewegen en dat de gang van de dieren makkelijk kan worden waargenomen.

Het toedienen van de teststof gebeurt gewoonlijk langs orale weg door middel van een maagsonde, gelatinecapsules of een vergelijkbare methode. Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maïsolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn. Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

## 1.5.2. Proefomstandigheden

## 1.5.2.1. Proefdieren

Het gebruik van jonge volwassen leghennen (*Gallus gallus domesticus*) van 8-12 maanden wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van rassen en stammen van normale grootte en de hennen moeten zijn gefokt onder omstandigheden die vrij bewegen mogelijk maken.

## 1.5.2.2. Aantal en geslacht

Als aanvulling op de behandelde groep moet een controlegroep (vehiculum) en een positieve controlegroep worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de teststof wordt achterwege gelaten.

Iedere groep vogels moet uit zoveel hennen bestaan dat er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 21 dagen kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

Als positieve controle kan een gelijktijdig geobserveerde groep worden gebruikt of een groep uit een recent verricht onderzoek. De groep moet uit ten minste zes hennen bestaan die worden behandeld met een stof waarvan bekend is dat deze een vertraagd neurotoxische werking heeft. Drie hennen zijn bestemd voor biochemisch onderzoek en drie voor pathologisch onderzoek. Aangeraden wordt om gegevens uit eerdere onderzoeken periodiek aan te vullen. Als een essentieel onderdeel van de proef door het uitvoerend laboratorium wordt veranderd (bij voorbeeld stam, voedsel, behuizing), moeten nieuwe positieve controlegegevens worden ontwikkeld.

## 1.5.2.3. Dosisniveaus

Om het dosisniveau in het hoofdonderzoek vast te stellen moet een vooronderzoek worden verricht met een voldoende aantal hennen en dosisniveaugroepen. Er dient, om een juist dosisniveau voor de hoofdstudie te kunnen vaststellen, normaal gesproken enige mortaliteit op de treden in deze voorstudie. Om echter sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, kan atropine of een ander preventief middel, waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neurotoxische reacties, worden toegediend. Voor het vaststellen van de maximale niet-letale dosis van teststoffen kan een aantal verschillende methoden worden gebruikt (zie methode B.1bis). Gegevens uit eerdere onderzoeken bij de hen of andere toxicologische gegevens kunnen ook nuttig zijn bij de keuze van de dosis.

Het dosisniveau van de teststof in de hoofdstudie moet zo hoog mogelijk liggen, rekening houdend met de resultaten van de voorstudie en de bovengrens van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. Als er tussentijdse mortaliteit optreedt mag dit er niet toe leiden dat er te weinig proefdieren overblijven voor biochemisch (6) en pathologisch (6) onderzoek na 21 dagen. Ter voorkoming van sterfte door acute cholinerge effecten kan atropine of een ander preventief middel worden toegediend waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neurotoxische reacties.

#### 1.5.2.4. Limiettest

Als een test op een dosisniveau van ten minste 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

#### 1.5.2.5. Observatieperiode

De observatieperiode dient 21 dagen te zijn.

#### 1.5.3. Procedure

Na toediening van een preventief middel om sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, wordt de teststof in één enkele dosis toegediend.

##### 1.5.3.1. Algemene observatie

Het observeren moet onmiddellijk na het toedienen beginnen. Alle hennen moeten gedurende de eerste twee dagen enkele malen per dag worden geobserveerd en daarna ten minste eenmaal per dag over een periode van 21 dagen of totdat de dieren worden gedood. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur van abnormaal gedrag. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlamningsverschijnselen. De hennen die zijn geselecteerd voor pathologie moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren en dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

##### 1.5.3.2. Lichaamsgewicht

Alle dieren worden vlak voor het toedienen van de teststof en daarna minstens éénmaal per week gewogen.

##### 1.5.3.3. Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen en drie hennen uit de positieve controlegroep (als die tegelijkertijd wordt onderzocht) moeten binnen een paar dagen na toediening worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen na 24 uur drie vogels gedood en na 48 uur nog eens drie, terwijl de drie hennen van de positieve controlegroep na 24 uur worden gedood. Als de waarneming van klinische verschijnselen van toxiciteit (vaak op grond van het begin van cholinerge verschijnselen) er op duidt dat de toxische stof zeer langzaam wordt uitgescheiden, kan het aan te bevelen zijn om op twee tijdstippen tussen 24 uur en maximaal 72 uur na toediening weefsel van drie vogels te verzamelen.

Bepaling van acetylcholinesterase (AChE) kan ook bij deze monsters worden uitgevoerd als dat nodig lijkt. Er kan echter spontane reactivering van AChE in vivo optreden; dit kan leiden tot onderschatting van de remmende werking van de teststof op AChE.

##### 1.5.3.4. Macroscopische necropsie

Bij macroscopische necropsie van alle (volgens plan of omdat ze stervend waren) gedode dieren moet onder meer het uiterlijk van de hersenen en het ruggemerg worden onderzocht.

##### 1.5.3.5. Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht. Het weefsel moet in situ worden gefixeerd door perfusietechnieken. Andere dieren moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen.

## 2. GEGEVENS

Indien negatieve resultaten worden behaald met betrekking tot de parameters van deze methoden (biochemie, histopathologie en gedragsobservatie) is in het algemeen verder testen op vertraagde neurotoxiciteit niet nodig. Bij onduidelijke of dubbelzinnige resultaten voor deze parameters kan verdere evaluatie nodig zijn.

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle resultaten in tabelvorm worden gepresenteerd, waarbij voor iedere testgroep het aantal dieren bij aanvang moet worden vermeld, het aantal dieren dat laesies of gedrags- of biochemische effecten vertoont, het soort en de ernst van deze laesies of effecten en het percentage dieren dat een bepaalde laesie of een bepaald effect in een bepaalde mate vertoont.

De bevindingen van dit onderzoek moeten worden geëvalueerd wat betreft het voorkomen, de ernst en de correlatie van gedrags-, biochemische en histopathologische effecten en ieder ander waargenomen effect bij de behandelde en de controlegroepen.

Numerieke resultaten moeten geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De gebruikte statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

## 3. RAPPORTAGE

### Verslag van de proefnemingen

In het rapport moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- proefdieren :
- gebruikte stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, behuizing, enz.;

- individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.
- Proefomstandigheden :
  - bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar dat van toepassing is;
  - motivering van de keuze van het vehiculum;
  - bijzonderheden over de toediening van de teststof;
  - bijzonderheden over voedsel en water;
  - motivering van de dosiskeuze;
  - specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
  - naam van het eventueel toegediende preventieve middel en gegevens over de wijze van toediening.

#### Resultaten :

- gegevens over het lichaamsgewicht;
- gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar groep, met inbegrip van de mortaliteit;
- aard, ernst en duur van de klinische observaties (al of niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;
- necropsieverslagen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische bewerking van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 418 van de OESO.

### B.38 VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

#### 1. METHODE

##### 1.1. Inleiding

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische effecten van stoffen is het van belang rekening te houden met het vermogen van sommige soorten stoffen om specifieke typen neurotoxiciteit te veroorzaken die niet met andere toxiciteitstesten kunnen worden aangetoond. Bij sommige organische fosforverbindingen is waargenomen dat vertraagde neurotoxiciteit optreedt; deze stoffen moeten worden beschouwd als kandidaten voor evaluatie.

Door screening in vitro kan worden nagegaan welke stoffen vertraagde polyneuropathie kunnen veroorzaken; negatieve uitkomsten vormen echter geen bewijs dat de teststof niet neurotoxisch is.

Deze 28-daagse test op vertraagde neurotoxiciteit geeft informatie over mogelijke gevaren voor de gezondheid die zich kunnen voordoen bij herhaalde blootstelling gedurende een beperkte tijd en over de relatie tussen dosis en respons. Tevens kan op grond van de test een schatting worden gemaakt van een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten, hetgeen van nut kan zijn bij het vaststellen van veiligheidseisen bij blootstelling.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

##### 1.2. Definities

Organische fosforverbindingen omvatten ongeladen organische esters, thioesters of anhydriden van organische fosforzuren, organische fosforzuren of organische fosforamidezuren of van verwante fosforthiozuren, fosforthiozuren of fosforthioamidezuren, of andere stoffen die de vertraagde neurotoxiciteit kunnen veroorzaken die soms bij stoffen uit deze klasse wordt waargenomen.

Vertraagde neurotoxiciteit is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieën in het ruggemerg en perifere zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

##### 1.3. Principe van de testmethode

Aan hennen wordt dagelijks, gedurende 28 dagen, oraal een dosis van de teststof toegediend. De dieren worden tot 14 dagen na de laatste dosis tenminste eenmaal per dag geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlamingsverschijnselen. Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de laatste toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Twee weken na de laatste dosis worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

##### 1.4. Beschrijving van de testmethode

###### 1.4.1. Voorbereidingen

Gezonde jonge volwassen hennen die geen storende virusinfecties of medicatie hebben en die een normale gang vertonen worden aselekt verdeeld over behandelde en controlegroepen en ten minste gedurende vijf dagen voor de aanvang van het onderzoek geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden.

De kooien of verblijven moeten zó ruim zijn, dat de hennen vrij kunnen bewegen en dat de gang van de dieren makkelijk kan worden waargenomen.

Het toedienen van de teststof moet iedere dag plaatsvinden, zeven dagen per week, bij voorkeur door middel van een maagsonde of gelatinecapsules. Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maisolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn. Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

###### 1.4.2. Proefomstandigheden

###### 1.4.2.1. Proefdieren

Het gebruik van jonge volwassen leghennen (*Gallus gallus domesticus*), 8-12 maanden oud, wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van gangbare rassen en stammen van normale grootte en de hennen moeten zijn gefokt onder omstandigheden die vrij bewegen mogelijk maken.

#### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

In het algemeen moeten ten minste drie behandelde groepen en een controlegroep (vehiculum) worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de teststof wordt achterwege gelaten.

Iedere groep vogels moet uit zoveel hennen bestaan dat er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 14 dagen na de behandeling kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

#### 1.4.2.3. Dosisniveaus

De keuze dosisniveaus moet worden gemaakt met inachtneming van de resultaten van een acute test op vertraagde neurotoxiciteit en alle andere beschikbare gegevens over toxiciteit of kinetica van de teststof. Het hoogste dosisniveau moet gekozen worden met het doel toxische effecten te veroorzaken, bij voorkeur vertraagde neurotoxiciteit, zonder dat deze leiden tot sterfte of duidelijk lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus gekozen worden om het verband tussen dosis en respons aan te tonen en bij het laagste niveau te komen tot een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten.

#### 1.4.2.4. Limiettest

Als een test op een dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij de verwachte blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

#### 1.4.2.5. Observatieperiode

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd gedurende de periode van blootstelling en 14 dagen daarna of totdat ze worden geobduceerd.

#### 1.4.3. Procedure

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks (zeven dagen per week) aan de proefdieren toegediend.

##### 1.4.3.1. Algemene observaties

Het observeren moet onmiddellijk na de eerste toediening beginnen. Alle hennen moeten gedurende de periode van 28 dagen waarop de stof wordt toegediend en gedurende 14 dagen daarna of totdat ze worden gedood, tenminste eenmaal per dag worden geobserveerd. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur. Waarnemingen moeten onder meer, maar niet alleen, het observeren van abnormaal gedrag inhouden. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlamningsverschijnselen. De hennen moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

##### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht

Alle dieren worden vlak voor het toedienen van de teststof en daarna minstens éénmaal per week gewogen.

##### 1.4.3.3. Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen moeten binnen een paar dagen na toediening van de laatste dosis worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel (NTE) te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen drie vogels 24 uur en drie vogels 48 uur na de laatste dosis gedood. Als gegevens van het acute onderzoek of andere (bij voorbeeld toxicokinetische) onderzoeken er op duiden dat het doden na de laatste dosis beter op een ander tijdstip kan gebeuren, dan moet dat tijdstip aangehouden worden en de motivering worden gedocumenteerd.

Bepaling van acetylcholinesterase (AChE) kan ook bij deze monsters worden uitgevoerd als dat nodig lijkt. Er kan echter spontane reactivering van AChE in vivo optreden; dit kan leiden tot onderschatting van de remmende werking van de teststof op AChE.

##### 1.4.3.4. Macroscopische necropsie

Bij macroscopische necropsie van alle (volgens plan of omdat ze stervend waren) gedode dieren moet onder meer het uiterlijk van de hersenen en het ruggemerg worden onderzocht.

##### 1.4.3.5. Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht. Het weefsel moet in situ worden gefixeerd door perfusietechnieken. Onder andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen. In eerste instantie moet microscopisch onderzoek worden verricht op de geprepareerde weefsels van alle dieren uit de controlegroep en de groep met de hoogste dosis. Als er aanwijzingen zijn voor effecten in de groep met de hoogste dosering, moeten ook dieren uit de groepen met lagere doseringen worden onderzocht.

## 2. GEGEVENS

Indien negatieve resultaten worden behaald met betrekking tot de parameters van deze methode (biochemie, histopathologie en gedragsobservatie) is in het algemeen verder testen op vertraagde neurotoxiciteit niet nodig. Bij onduidelijke of dubbelzinnige resultaten voor deze parameters kan verdere evaluatie nodig zijn.

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle resultaten in tabelvorm worden gepresenteerd, waarbij voor iedere testgroep moeten worden vermeld het aantal dieren bij aanvang, het aantal dieren dat laesies of gedrags- of biochemische effecten vertoont, het soort en de ernst van deze laesies of effecten en het percentage dieren dat een bepaalde laesie of een bepaald effect in een bepaalde mate vertoont.



De bevindingen van dit onderzoek moeten worden geëvalueerd wat betreft het voorkomen, de ernst en de correlatie van gedrags-, biochemische en histopathologische effecten en ieder ander waargenomen effect bij de behandelde en de controlegroepen.

Numerieke resultaten moeten worden geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De te gebruiken statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

### 3. RAPPORTAGE

Verslag van de proefnemingen

In het rapport moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

Proefdieren :

- gebruikte stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, behuizing, enz.;
- individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

Proefomstandigheden :

- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar van toepassing;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof;
- bijzonderheden over voedsel en water;
- motivering van de dosiskeuze;
- specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- motivering van de keuze van andere tijden voor de biochemische bepaling dan 24 en 48 uur.

Resultaten :

- gegevens over het lichaamsgewicht;
- gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar dosisniveau, met inbegrip van de mortaliteit;
- niveau waarop geen schadelijke effecten werden waargenomen (NOAEL);
- aard, ernst en duur van de klinische observaties (al dan niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;
- necropsieverslagen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische bewerking van de resultaten, indien dit van toepassing is.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

### 4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 419 van de OESO. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

—  
Bijlage III

A. De punten 8 en 9 van de inhoudsopgave van de bijlage worden vervangen door onderstaande punten :

„8. SPECIALE GEVALLEN : stoffen

8.1. Mobiele gascilinders

8.2. Gascilinders, bedoeld voor propaan, butaan en vloeibaar petroleumgas (LPG)

8.3. Metalen in massieve vorm

8.4. Stoffen die zijn ingedeeld met waarschuwingszin R65

9. SPECIALE GEVALLEN : preparaten

9.1. Gasvormige preparaten (gasmengsels)

9.2. Gascilinders, bedoeld voor preparaten die propaan, butaan en vloeibaar petroleumgas (LPG) bevatten, waaraan een stinkende stof is toegevoegd

9.3. Legeringen, preparaten die polymeren bevatten, preparaten die elastomeren bevatten

9.4. Preparaten die zijn ingedeeld met waarschuwingszin R65

9.5. Organische peroxiden”

B. De volgende tekst wordt ingevoegd onder punt 3.2.3, na de criteria in verband met R20 „Schadelijk bij inademing“ :

„R65 Schadelijk : kan longschade veroorzaken na verslikken

Vloeibare stoffen en preparaten die een inademingsgevaar opleveren voor de mens vanwege hun lage viscositeit :

a) Stoffen en preparaten die alifatische (al dan niet cyclisch) en aromatische koolwaterstoffen in een totale concentratie van ten minste 10 % bevatten, en welke

- hetzij een doorstroomtijd van minder dan 30 sec. in een 3 mm ISO-beker overeenkomstig EN 535,

- hetzij een kinematische viscositeit, gemeten met een gekalibreerde glazen capillaire viscosimeter volgens ISO-norm 3104/3105, van minder dan  $7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ . bij 40 °C,

- hetzij een kinematische viscositeit, gemeten met een rotatieviscosimeter volgens ISO-norm 3219, van minder dan  $7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ . bij 40 °C hebben.

Merk op dat stoffen en preparaten die aan bovengenoemde criteria voldoen niet als schadelijk behoeven te worden ingedeeld als hun gemiddelde oppervlaktespanning groter is dan 25 mN/m bij 40 °C.

b) Andere stoffen en preparaten, die niet voldoen aan bovengenoemde criteria, op basis van praktische ervaring bij de mens. »

C. De tekst van punt 3.2.6.3 wordt vervangen door de volgende tekst :

„3.2.6.3. Irriterend voor de ademhalingswegen

De volgende waarschuwingzin wordt toegekend overeenkomstig de gegeven criteria :

R37 Irriterend voor de ademhalingswegen

Stoffen en preparaten die ernstige irritatie voor de ademhalingswegen veroorzaken, op grond van :

- waarnemingen bij de mens;

- positieve resultaten van geschikte dierproeven.

Opmerking in verband met het gebruik van waarschuwingzin R37

Bij de interpretatie van de waarnemingen bij de mens moet zorgvuldig een onderscheid worden gemaakt tussen effecten die leiden tot een indeling met waarschuwingzin R48 (zie punt 3.2.4) en effecten die leiden tot indeling met zin R37. Effecten die tot indeling met zin R37 leiden, zijn omkeerbaar en zijn doorgaans beperkt tot de bovenste luchtwegen.

Positieve resultaten van geschikte dierproeven kunnen gegevens omvatten die verkregen zijn met behulp van een algemene toxiciteitstest, met inbegrip van histopathologische gegevens met betrekking tot het ademhalingsstelsel. Om de irritatie van luchtwegen te evalueren mogen ook gegevens uit de meting van experimentele bradypnee worden gebruikt. »

D. De tekst van punt 3.2.7 Sensibiliserend wordt vervangen door de volgende tekst :

„3.2.7. Sensibiliserend

3.2.7.1. Overgevoeligheid bij inademing

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als sensibiliserend en gekenmerkt met het symbool Xn, de aanduiding „schadelijk“ en de waarschuwingzin R42 overeenkomstig de onderstaande criteria :

R42 Kan overgevoeligheid veroorzaken bij inademing

- indien er gegevens zijn dat de stoffen of preparaten door inademing specifieke overgevoeligheidsreacties kunnen veroorzaken;

- indien er positieve resultaten zijn van geschikte dierproeven;

- indien de stof een isocyaan is, tenzij bewezen is dat de stof bij inademing geen overgevoeligheid veroorzaakt.

Opmerkingen m.b.t. het gebruik van R42

Gegevens bij de mens

Gegevens dat een stof door inademing specifieke overgevoeligheidsreacties kan veroorzaken, zullen normaal gebaseerd zijn op waarnemingen bij de mens. In die context wordt bij overgevoeligheid doorgaans aan astma gedacht, maar ook andere overgevoeligheidsreacties, zoals rhinitis en alveolitis, moeten worden beschouwd. De conditie moet het klinisch karakter van een allergische reactie hebben. Immunologische mechanismen behoeven echter niet te worden aangetoond.

Bij de evaluatie van de gegevens met betrekking tot de blootstelling bij de mens moet, alvorens een beslissing wordt genomen inzake de indeling van de stof, ook rekening worden gehouden met :

- de omvang van de blootgestelde populatie;

- de mate van blootstelling.

Met bovengenoemde gegevens wordt bedoeld :

- klinische voorgeschiedenis en resultaten van geschikte longfunctieproeven m.b.t. de blootstelling aan de stof, bevestigd door aanvullende bewijzen zoals :

- een chemische structuur die verwant is aan de structuur van stoffen waarvan bekend is dat zij bij inademing overgevoeligheidsreacties veroorzaken;

- in vivo immunologische proeven (b.v. huidprikken);

- in vitro immunologische proeven (b.v. serologische analyse);

- studies die kunnen wijzen op andere specifieke, maar niet-immunologische werkingsmechanismen, b.v. herhaaldelijke beperkte irritatie, effecten van geneesmiddelen.

- resultaten van positieve bronchiale provocatieproeven met de stof, verricht overeenkomstig algemeen aanvaarde richtsnoeren voor de bepaling van specifieke overgevoeligheidsreacties.

De klinische voorgeschiedenis moet zowel het medische als het beroepsverleden omvatten, zodat het verband kan worden vastgesteld tussen de blootstelling aan een specifieke stof en het ontstaan van overgevoeligheid bij inademing. Tot de relevante informatie behoren eveneens verergerende factoren thuis en op het werk, het begin en het verloop van de ziekte, familiale voorgeschiedenis en medische voorgeschiedenis van de patient. In de medische voorgeschiedenis moet ook worden vermeld of er andere allergische reacties of aandoeningen van de luchtwegen in de kinderjaren zijn voorgekomen en of men roker is (geweest).

De resultaten van positieve bronchiale provocatieproeven worden op zich als voldoende bewijs voor de indeling beschouwd. In de praktijk zullen echter reeds een groot aantal van bovengenoemde onderzoeken zijn verricht.

Aan stoffen die slechts bij mensen met een bronchiale hyperreactiviteit door middel van irritatie symptomen van astma oproepen, behoeft geen R42 zin te worden toegekend.

#### Dierproeven

Tot de gegevens van testen die indicatief zijn voor mogelijke overgevoeligheidsreacties via inademing bij de mens behoren de resultaten van :

- IgE-metingen (b.v. bij muizen);
- specifieke pulmonaire reacties bij cavia's.

#### 3.2.7.2. Overgevoeligheid bij contact met de huid

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als sensibiliserend en gekenmerkt met het symbool Xi, de gevaarsaanduiding „irriterend” en de waarschuwingzin R43 overeenkomstig de onderstaande criteria :

R43 Kan overgevoeligheid veroorzaken bij contact met de huid

- indien uit de praktijk blijkt dat de stoffen en preparaten bij een aanzienlijk aantal mensen via huidcontact een overgevoeligheidsreactie teweeg kunnen brengen;
- op grond van positieve reacties bij proefdieren.

Opmerkingen m.b.t. het gebruik van R43

Gegevens bij de mens

De volgende gegevens (ervaring uit de praktijk) volstaan om een stof in te delen met zin R43 :

- positieve resultaten van geschikte patch-tests, normaliter in meer dan één dermatologische kliniek, of
- epidemiologische studies waaruit blijkt dat de stof allergische contactdermatitis veroorzaakt. Situaties waarbij een groot deel van de blootgestelden karakteristieke symptomen vertoont moeten met bijzondere aandacht worden bekeken, zelfs wanneer het aantal gevallen klein is, of
- positieve resultaten van experimentele studies bij de mens (zie ook 3.1.1).

De volgende aanwijzingen volstaan om aan een stof zin R43 toe te kennen wanneer er ondersteunende gegevens zijn :

- afzonderlijke episodes van allergische contactdermatitis, of
- epidemiologische studies waarbij toeval, vooroordeel of verstoringen niet volledig met redelijke zekerheid kunnen worden uitgesloten.

Als ondersteunende gegevens kunnen gelden :

- resultaten van overeenkomstig de bestaande richtlijnen uitgevoerde dierproeven, die niet geheel voldoen aan de in het hoofdstuk over dierproeven gegeven criteria, maar die de limiet voldoende benaderen om als betekenisvol te kunnen worden beschouwd, of
- niet met standaardmethoden verkregen gegevens, of
- geschikte structuuractiviteitsrelaties.

#### Dierproeven

Positieve resultaten van geschikte dierproeven zijn :

bij toepassing van de in bijlage V opgenomen adjuvans-testmethode voor overgevoeligheid van de huid of van andere typen testmethoden die gebruik maken van een adjuvans, wordt een respons van ten minste 30 % van de dieren als positief beschouwd. Voor elke andere testmethode wordt een respons van ten minste 15 % van de dieren als positief beschouwd.

#### 3.2.7.3. Immunologische contacturticaria

Sommige stoffen die voldoen aan de criteria voor R42 kunnen daarenboven immunologische contacturticaria veroorzaken. In dat geval moet informatie betreffende contacturticaria worden aangegeven door gebruik van de passende S-zinnen, doorgaans S24 en S36/37, alsmede door opname van die informatie in het inlichtingenblad aangaande de veiligheid.

Met betrekking tot stoffen waarvoor aanwijzingen bestaan dat ze immunologische contacturticaria veroorzaken, en welke niet voldoen aan de criteria voor toekenning van zin R42, moet toekenning van zin R43 worden overwogen.

Er is geen erkend diermodel beschikbaar ter identificatie van stoffen die immunologische contacturticaria veroorzaken. Een desbetreffende indeling zal doorgaans gebeuren op basis van gegevens bij de mens, en wel op soortgelijke wijze als in verband met overgevoeligheid bij contact met de huid (R43).

3.2.7.4. Opgemerkt wordt dat indien het symbool Xn en de gevaarsaanduiding „schadelijk” zijn toegekend, het symbool Xi en de gevaarsaanduiding „irriterend” facultatief zijn. »

E. De tekst van de criteria voor toekenning van veiligheidsaanbeveling S62 onder punt 6 wordt vervangen door de volgende tekst :

„S62 Bij inslikken niet het braken opwekken; direct een arts raadplegen en de verpakking of het etiket tonen

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die als schadelijk zijn ingedeeld en waaraan R65 is toegekend overeenkomstig de in punt 3.2.3 gegeven criteria;
- niet van toepassing op stoffen en preparaten die in spuitbussen (of in houders die zijn voorzien van een vaste verstuiver) op de markt worden gebracht; zie onder de punten 8 en 9.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor de bovengenoemde stoffen en preparaten indien ze aan het grote publiek worden verkocht of waarschijnlijk door het grote publiek worden gebruikt;
- aanbevolen voor de bovengenoemde stoffen en preparaten wanneer die in de industrie worden gebruikt. »

F. Het volgende punt wordt toegevoegd onder punt 8 :

„8.2. Gascilinders, bedoeld voor propaan, butaan of vloeibaar petroleumgas (LPG)

Deze stoffen zijn ingedeeld in bijlage I. Hoewel zij zijn ingedeeld overeenkomstig artikel 1, § 4, vormen zij geen gevaar voor de volksgezondheid wanneer zij op de markt worden gebracht in afgesloten navulbare cilinders of in niet-navulbare gashouders in de zin van EN 417 als brandstof, waarbij zij alleen vrijkomen voor verbranding.

Bedoelde cilinders of patronen moeten worden gekenmerkt met het passende symbool en de R- en S-zinnen betreffende hun ontvlambaarheid. Op het etiket hoeft geen informatie over de effecten op de volksgezondheid worden vermeld. De normaliter op het etiket te vermelden informatie betreffende de effecten op de volksgezondheid dient evenwel door de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van de stof in de in artikel 9, § 2, van dit besluit omschreven vorm aan de professionele gebruiker te worden verstrekt. Aan de consument moet voldoende informatie worden verstrekt om hem in staat te stellen alle in artikel 12, § 3, van het Koninklijk Besluit van 11 januari 1993, omschreven maatregelen op het gebied van bescherming van de veiligheid en gezondheid te nemen. »

G. Het hoofdje van punt „8.2 Metalen in massieve vorm” wordt vervangen door :

„8.3. Metalen in massieve vorm”

H. Het volgende punt wordt toegevoegd onder punt 8 :

„8.4. Stoffen waaraan zin R65 is toegekend

Stoffen die als schadelijk zijn ingedeeld op basis van gevaren bij inademing moeten niet als schadelijk met toekenning van R65 worden ingedeeld wanneer zij op de markt worden gebracht in spuitbussen of houders voorzien van een vaste verstuiver. »

I. De tekst van punt 9.1.3 wordt vervangen door onderstaande tekst :

„9.1.3. Etikettering

Voor mobiele gascilinders geldt dat aan de etiketteringseisen geacht wordt te zijn voldaan wanneer die in overeenstemming zijn met artikel 10, § 5, van het Koninklijk Besluit van 11 januari 1993.

In afwijking van artikel 10, § 1 en 2, kunnen bij gascilinders met een watercapaciteit van ten hoogste 150 liter voor de opmaak en de afmetingen van het etiket evenwel de bepalingen van ISO-norm ISO/DP 7225 worden gevolgd. In dat geval mag het etiket de gangbare benaming of industriële/handelsbenaming van het preparaat dragen, vooropgesteld dat de namen van de gevaarlijke stoffen in het preparaat duidelijk en onuitwisbaar op de buitenkant van de gascilinder worden vermeld.

De in artikel 9 bedoelde informatie mag worden verstrekt op een duurzaam informatieplaatje of -schijfje dat in de houder is geïntegreerd. »

J. Het volgende punt wordt toegevoegd onder punt 9 :

„9.2. Gascilinders, bedoeld voor propaan, butaan of vloeibaar petroleumgas (LPG) waaraan een stinkende stof is toegevoegd

Propaan, butaan en vloeibaar petroleumgas (LPG) zijn ingedeeld in bijlage I. Hoewel de preparaten die deze stoffen bevatten zijn ingedeeld overeenkomstig artikel 5 van het KB van 11 januari 1993, vormen zij geen gevaar voor de volksgezondheid wanneer zij op de markt worden gebracht in afgesloten navulbare cilinders of in niet-navulbare gashouders in de zin van EN 417 als brandstof, waarbij zij alleen vrijkomen voor verbranding.

Bedoelde cilinders en patronen moeten worden gekenmerkt met het passende symbool en de R- en S-zinnen betreffende hun ontvlambaarheid. Op het etiket hoeft geen informatie over de effecten op de gezondheid van de mens te worden vermeld. De normaliter op het etiket te vermelden informatie betreffende de effecten op de gezondheid van de mens dient evenwel door de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van het preparaat in de in artikel 12 van het KB van 11 januari 1993 omschreven vorm aan de professionele gebruiker te worden verstrekt. Aan de consument moet voldoende informatie worden verstrekt om hem in staat te stellen alle in artikel 12, § 3, van het KB van 11 januari 1993 omschreven maatregelen op het gebied van bescherming van de veiligheid en gezondheid te nemen. »

K. Het hoofdje van punt „9.2 Legeringen, preparaten die polymeren bevatten, preparaten die elastomeren bevatten” wordt vervangen door :

„9.3. Legeringen, preparaten die polymeren bevatten, preparaten die elastomeren bevatten”

L. Het volgende punt wordt toegevoegd onder punt 9 :

„9.4. Preparaten waaraan zin R65 is toegekend

Preparaten die als schadelijk zijn ingedeeld op basis van gevaren bij inademing behoeven niet als schadelijk met toekenning van R65 worden ingedeeld wanneer zij op de markt worden gebracht in spuitbussen of houders voorzien van een vaste verstuiver. »

M. Het hoofdje van punt „9.4 Organische peroxiden” wordt vervangen door :

„9.5. Organische peroxiden”

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 december 1998.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,  
Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS