

**SERVICE PUBLIC FEDERAL SANTE PUBLIQUE,
SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE
ET ENVIRONNEMENT**

F. 2005 — 1634

[C — 2005/22332]

17 MARS 2005. — 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 21 décembre 1998 relative aux normes de produits ayant pour but la promotion de modes de production et de consommation durables et la protection de l'environnement et de la santé, notamment l'article 5, § 1^{er}, premier alinéa, 5°.

Vu la directive 2004/73/CE de la Commission du 29 avril 2004 portant vingt-neuvième 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, 19 juillet 1994, 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, 25 novembre 1999, 4 février 2000, 28 septembre 2000, 11 juillet 2001, 14 septembre 2001 et du 17 juillet 2002, dont l'article 2, § 7, 1^o, e, alinéa 2, a été modifié par l'arrêté ministériel du 5 septembre 2001 et dont l'annexe VI a été rectifiée par l'arrêté ministériel du 10 octobre 2000;

Vu l'association des Gouvernements de région à l'élaboration du présent arrêté;

Vu les notifications faites, au Conseil fédéral du Développement durable, au Conseil supérieur d'Hygiène, au Conseil de la Consommation et au Conseil central de l'Economie, le 18 octobre 2004;

Vu l'avis de l'Inspecteur des Finances, donné le 24 septembre 2004;

Vu l'avis 37 913/3 du Conseil d'Etat, donné le 4 janvier 2005 en application de l'article 84, § 1^{er}, alinéa 1^{er}, 1^o, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, remplacé par la loi du 4 août 1996;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Santé publique et de Notre Ministre de l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

Article 1^{er}. 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, sont modifiées comme suit :

1^o L'annexe V complétée par l'arrêté royal du 14 septembre 1989 et modifiée par les arrêtés royaux des 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, 4 février 2000, 11 juillet 2001, 14 septembre 2001 et du 17 juillet 2002 est modifiée comme suit :

(a) le texte figurant à l'annexe IA du présent arrêté est ajouté en tant que chapitre A.21;

(b) le chapitre B.1. bis est remplacé par le texte figurant à l'annexe IB du présent arrêté;

(c) le chapitre B.1. ter. est remplacé par le texte figurant à l'annexe IC du présent arrêté;

(d) le chapitre B.4. est remplacé par le texte figurant à l'annexe ID du présent arrêté;

(e) le chapitre B.5. est remplacé par le texte figurant à l'annexe IE du présent arrêté;

(f) le chapitre B.31. est remplacé par le texte figurant à l'annexe IF du présent arrêté;

(g) le chapitre B.35. est remplacé par le texte figurant à l'annexe IG du présent arrêté;

(h) le texte figurant à l'annexe IH du présent arrêté est ajouté en tant que chapitres B.42 et B.43;

(i) le texte figurant à l'annexe I I du présent arrêté est ajouté en tant que chapitres C.21 à C.24.

**FEDERALE OVERHEIDSDIENST VOLKSGEZONDHEID,
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN
EN LEEFMILIEU**

N. 2005 — 1634

[C — 2005/22332]

17 MAART 2005. — 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 21 december 1998 betreffende de productnormen ter bevordering van duurzame productie- en consumptiepatronen en ter bescherming van het leefmilieu en de volksgezondheid, inzonderheid op artikel 5, § 1, eerste lid 5°.

Gelet op de richtlijn 2004/73/EG van de Commissie van 29 april 2004 tot negenentwintigste 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;

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, 19 juli 1994, 13 november 1997, 14 december 1998, 25 november 1999, 4 februari 2000, 28 september 2000, 11 juli 2001, 14 september 2001 en van 17 juli 2002, waarvan artikel 2, § 7, 1^o, e, tweede lid, gewijzigd werd bij het ministerieel besluit van 5 september 2001 en waarvan bijlage VI gerectificeerd werd bij het ministerieel besluit van 10 oktober 2000;

Gelet op de omstandigheid dat de Gewestregeringen bij het ontwerpen van dit besluit betrokken zijn;

Gelet op de kennisgeving aan de Federale Raad voor Duurzame Ontwikkeling, de Hoge Gezondheidsraad, de Raad voor het Verbruik en de Centrale Raad voor het Bedrijfsleven op 18 oktober 2004;

Gelet op het advies van de Inspecteur van Financiën, gegeven op 24 september 2004;

Gelet op het advies 37913/3 van de Raad van State gegeven op 4 januari 2005 met toepassing van artikel 84, § 1, eerste lid, 1^o, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, vervangen door de wet van 4 augustus 1996;

Op de voordracht van Onze Minister van Volksgezondheid en van onze Minister van 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, worden gewijzigd als volgt :

1^o Bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd door de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998, 4 februari 2000, 11 juli 2001, 14 september 2001 en van 17 juli 2002 wordt gewijzigd als volgt :

(a) de in bijlage IA bij dit besluit opgenomen tekst wordt toegevoegd als hoofdstuk A.21;

(b) hoofdstuk B.1. bis wordt vervangen door de tekst in bijlage IB bij dit besluit;

(c) hoofdstuk B.1. ter wordt vervangen door de tekst in bijlage IC bij dit besluit;

(d) hoofdstuk B.4. wordt vervangen door de tekst in bijlage ID bij dit besluit;

(e) hoofdstuk B.5. wordt vervangen door de tekst in bijlage IE bij dit besluit;

(f) hoofdstuk B.31. wordt vervangen door de tekst in bijlage IF bij dit besluit;

(g) hoofdstuk B.35 wordt vervangen door de tekst in bijlage IG bij dit besluit;

(h) de tekst in bijlage IH bij dit besluit wordt toegevoegd als hoofdstuk B.42 en hoofdstuk B.43;

(i) de tekst in bijlage I I bij dit besluit wordt toegevoegd als de hoofdstukken C.21 tot en met C.24.

Art. 2. Notre Ministre qui a la Santé publique dans ses attributions et Notre Ministre qui a l'Environnement dans ses attributions sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

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

Gegeven te Brussel, 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Annexe 1A

« A.21. PROPRIETES COMBURANTES (LIQUIDES)

1. METHODE

1.1 INTRODUCTION

La présente méthode vise à déterminer l'aptitude d'un liquide à accroître la vitesse de combustion ou l'intensité de la combustion d'une substance combustible, ou de provoquer l'inflammation spontanée d'une substance combustible avec laquelle il est mélangé de manière homogène. La méthode repose sur l'épreuve des Nations Unies pour les liquides comburants (1) et en est l'équivalent. Toutefois, comme cette méthode A.21 est avant tout conçue pour satisfaire aux exigences de l'arrêté royal du 24 mai 1982, une seule substance de référence est nécessaire pour effectuer la comparaison. Il peut être nécessaire d'effectuer des tests et des comparaisons avec d'autres substances de référence lorsque les résultats du test doivent être utilisés à d'autres fins¹.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer ce test lorsque l'examen de la formule structurale établit indubitablement que la substance est incapable de présenter une réaction exothermique avec un combustible.

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les éventuelles propriétés explosives de la substance avant de pratiquer ce test.

Ce test ne s'applique pas aux solides, gaz, substances explosives ou hautement inflammables, ni aux peroxydes organiques.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer ce test lorsque l'on dispose déjà, pour la substance concernée, des résultats de l'épreuve des Nations Unies pour les liquides comburants (1).

1.2 DEFINITIONS ET UNITES

Le temps moyen de montée en pression est la moyenne des temps mesurés pour que le mélange testé produise une élévation de pression de 690 kPa à 2070 kPa au-dessus de la pression atmosphérique.

1.3 SUBSTANCE DE REFERENCE

La substance de référence est une solution aqueuse d'acide nitrique (qualité pour analyse) à 65 % (poids/poids)²

Le cas échéant, si l'expérimentateur prévoit que les résultats de ce test seront peut-être utilisés à d'autres fins¹ il peut également être indiqué de tester d'autres substances de référence³.

1.4 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Le liquide à tester est mélangé avec de la cellulose fibreuse dans un rapport massique de 1 pour 1 et placé dans une bombe. Si le mélange s'enflamme spontanément lors du mélange ou du remplissage, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai.

Si le mélange ne s'enflamme pas spontanément, il y lieu d'effectuer l'essai complet. Le mélange est chauffé dans la bombe et le temps moyen que met la pression pour s'élever de 690 kPa à 2070 kPa au-dessus de la pression atmosphérique est déterminé. Ce résultat est comparé au temps moyen de montée en pression pour le mélange 1 : 1 de la (des) substance(s) de référence et de cellulose.

1.5 CRITERES DE QUALITE

Dans une série de cinq essais sur une substance, aucun résultat ne devrait s'écarter de plus de 30 % de la moyenne arithmétique. Les résultats qui diffèrent de plus de 30 % de la moyenne devraient être rejetés, la procédure de mélange et de remplissage améliorée et les essais répétés.

1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1 Préparation

1.6.1.1 Substance combustible

Comme matériau combustible on utilise de la cellulose fibreuse séchée ayant une longueur de fibre comprise entre 50 et 250 µm pour un diamètre de 25 µm⁴. On la fait sécher en couche de moins de 25 mm d'épaisseur à 105 °C pendant 4 heures jusqu'à obtention d'un poids constant, puis on la maintient dans un dessiccateur en présence de dessiccant jusqu'à refroidissement et utilisation. La teneur en eau doit être inférieure à 0,5 % en masse (rapportée au poids sec)⁵. Si cela est nécessaire pour satisfaire à cette condition, la durée de séchage doit être prolongée⁶. Le même lot de cellulose doit être utilisé tout au long des essais.

1.6.1.2 Appareillage

1.6.1.2.1 Bombe

On doit disposer d'une bombe. Le dispositif d'essai est constitué par une bombe cylindrique en acier de 89 mm de longueur et de 60 mm de diamètre extérieur (voir figure 1). La bombe comporte deux plats usinés en des points diamétralement opposés (réduisant sa largeur à cet endroit à 50 mm), ce qui permet de l'immobiliser pour le serrage du bouchon de mise à feu et du bouchon à évent. Elle est alésée intérieurement à 20 mm et comporte aux deux extrémités un chambrage de 19 mm de profondeur taraudé au pas de 1 en tube normalisé BSP (British Standard Pipe) ou son équivalent métrique. Une prise de pression est vissée latéralement dans le corps de la bombe à 35 mm d'une extrémité, et à un angle de 90° par rapport aux plats. Elle se visse dans un chambrage de 12 mm de profondeur taraudé au pas de 1/2 en tube normalisé BSP (ou l'équivalent métrique). Si nécessaire, un joint en un matériau inerte est utilisé pour assurer l'étanchéité au gaz. La prise de pression fait saillie latéralement de 55 mm par rapport au corps de la bombe et elle est percée d'un trou axial de 6 mm. Elle comporte à son extrémité extérieure un chambrage taraudé pour recevoir un capteur de pression du type à diaphragme. Tout autre type de dispositif de mesure de la pression peut être utilisé, à condition qu'il résiste aux gaz chauds et produits de décomposition et qu'il puisse réagir à des accroissements de pression de 690 à 2070 kPa en moins de 5 ms.

L'extrémité de la bombe la plus éloignée du raccord est fermée par un bouchon fileté qui porte deux électrodes, dont l'une est isolée du corps du bouchon et l'autre mise à la masse. L'autre extrémité est fermée par un disque de rupture en aluminium de 0,2 mm d'épaisseur (taré à une pression d'environ 2200 kPa), maintenu en place par un bouchon comportant un évent de 20 mm. Si nécessaire, un joint inerte est utilisé pour assurer la bonne étanchéité entre le bouchon et la bombe. Un porte-bombe spécial (figure 2) permet de maintenir la bombe dans la position voulue pendant les essais. Il est généralement constitué par une embase en acier doux de 235 mm x 184 mm x 6 mm, sur laquelle est soudé obliquement un tube de section carrée (de 70 mm x 70 mm x 4 mm) de 185 mm de longueur.

A une extrémité du tube carré, on a enlevé une certaine longueur de métal sur deux faces opposées, ce qui laisse une longueur de 86 mm de tube carré prolongée par deux côtés plats. Les extrémités de ces plats sont coupées à 60° par rapport à l'axe du tube et soudées à la plaque d'embase. Une encoche de 22 mm de large et de 46 mm de profondeur est découpée sur un côté en haut du tube carré, de telle manière que lorsque la bombe repose sur le support, bouchon de mise à feu vers la base, le raccord de prise de pression vienne s'y loger. Une entretoise en acier de 30 mm de largeur et 6 mm d'épaisseur est soudée sur la paroi intérieure du tube du côté orienté vers le bas. Deux trous taraudés dans le côté opposé reçoivent des vis à molettes de 7 mm, qui servent à fixer la bombe. Deux rebords en acier de 12 mm de largeur et de 6 mm d'épaisseur, soudés sur les flancs du support à la base de la section carrée soutiennent la cuve par le fond.

1.6.1.2.2 Système d'allumage

Le système d'allumage est constitué par un enroulement de fil au Ni/Cr de 25 cm de longueur, de 0,6 mm de section, et d'une résistance électrique de 3,85 ohm/m. Le fil a été enroulé en forme de bobine sur un mandrin de 5 mm de diamètre; ses extrémités sont reliées aux électrodes du bouchon de mise à feu. La bobine doit avoir l'une des configurations présentées à la figure 3. La distance entre la face supérieure du bouchon et le point le plus bas de l'enroulement de chauffage doit être de 20 mm. Si les électrodes ne sont pas réglables en longueur, les deux sections de fil chauffant situées entre la bobine et la face supérieure du bouchon doivent être isolées par une gaine de céramique. Le fil doit être alimenté par une source électrique stable pouvant fournir une intensité d'au moins 10 A.

1.6.2 Réalisation de l'essai⁷

La bombe montée, avec son capteur de pression, mais non fermée par son disque de rupture, est posée bouchon d'allumage vers le bas dans son support. On mélange 2,5 g du liquide à essayer avec 2,5 g de cellulose séchée dans un bécher en verre à l'aide d'un agitateur en verre. Pour des raisons de sécurité, lors de cette opération, le manipulateur devrait s'abriter derrière un écran de protection. Si le mélange s'enflamme spontanément au cours du mélange ou du remplissage, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. On remplit la bombe en plusieurs fois en tassant par petits chocs contre un objet dur; on s'assure qu'il n'y a pas de vide autour de l'enroulement de chauffage et que le mélange est directement en contact avec celui-ci. On doit cependant veiller à ne pas déformer l'enroulement en tassant le mélange car cela pourrait entraîner des résultats erronés⁹. On met en place le disque de rupture et on visse le bouchon à évent en le bloquant. La bombe chargée est alors posée sur le porte-bombe, disque de rupture vers le haut, l'ensemble étant placé dans une hotte blindée ou dans une chambre de tir. On raccorde les bornes extérieures du bouchon de mise à feu à une source électrique et on applique au dispositif de chauffage un courant de 10 A. Il ne devrait pas s'écouler plus de 10 minutes entre le début de la préparation du mélange et le moment de la mise sous tension.

Le signal émis par le capteur de pression est enregistré sur un système permettant d'effectuer un enregistrement permanent de la courbe pression/temps et une analyse de cette courbe (enregistreur de signaux transitoires couplé à un enregistreur à bande de papier par exemple). Le mélange est chauffé jusqu'à rupture du disque ou pendant une durée d'au moins 60 s. S'il n'y a pas rupture, on doit attendre que le mélange ait refroidi avant d'ouvrir la bombe prudemment au cas où celle-ci serait encore sous pression. Cinq essais sont exécutés avec le mélange et avec chacune des substances de référence. On note le temps nécessaire pour monter de 690 kPa à 2070 kPa (pression manométrique). Le temps moyen de montée en pression est calculé.

Dans certains cas, des substances peuvent engendrer une augmentation de pression (trop élevée ou trop faible), due à des réactions chimiques non caractéristiques des propriétés comburantes de ces substances. Il peut alors se révéler nécessaire de répéter l'épreuve en remplaçant la cellulose par une substance inerte, par exemple la diatomite (kieselguhr), afin de s'assurer de la nature de la réaction.

2 DONNEES

Temps de montée en pression à la fois pour la substance à essayer et pour la (les) substance(s) de référence.

Temps de montée en pression pour les essais avec une substance inerte, le cas échéant.

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Le temps moyen de montée en pression est calculé à la fois pour la substance à essayer et pour la (les) substance(s) de référence.

Le temps moyen de montée en pression est calculé pour les essais réalisés avec une substance inerte (le cas échéant).

Le Tableau 1 présente quelques exemples

Tableau 1

Exemples de résultats ^{d)}

Substance ^{c)}	Temps moyen de montée en pression pour un mélange 1 : 1 avec de la cellulose (ms)
Dichromate d'ammonium, solution aqueuse saturée	20800
Nitrate de calcium, solution aqueuse saturée	6700
Nitrate ferrique, solution aqueuse saturée	4133
Perchlorate de lithium, solution aqueuse saturée	1686
Perchlorate de magnésium, solution aqueuse saturée	777
Nitrate de nickel, solution aqueuse saturée	6250
Acide nitrique, 65 %	4767 ^{a)}
Acide perchlorique, 50 %	121 ^{a)}
Acide perchlorique, 55 %	59
Nitrate de potassium, 30 % solution aqueuse	26690
Nitrate d'argent, solution aqueuse saturée	_b)
Chlorate de sodium, 40 % solution aqueuse	2555 ^{a)}
Nitrate de sodium, 45 % solution aqueuse	4133
<u>Substance inerte</u>	
Eau : cellulose	_b)

^{a)} Valeur moyenne d'après des essais interlaboratoires de comparaison

^{b)} Pression maximale de 2070 kPa non atteinte

^{c)} Les solutions saturées doivent être préparées à 20 °C

^{d)} Voir référence (1) pour le classement au transport selon le système des Nations unies

3 COMPTE-RENDU

3.1 COMPTE-RENDU DE L'ESSAI

Le compte-rendu de l'essai doit comprendre les informations suivantes :

- l'identité, la composition, la pureté, etc. de la substance essayée;
- la concentration de la substance;
- la méthode de séchage de la cellulose employée
- la teneur en eau de la cellulose utilisée
- le résultat des mesures;
- le résultat des essais réalisés avec une substance inerte, le cas échéant;
- les temps moyens de montée en pression calculés;
- tout écart par rapport à cette méthode et les raisons de celui-ci;
- toute information ou remarque complémentaire présentant un intérêt pour l'interprétation des résultats;

3.2 INTERPRETATION DES RESULTATS¹⁰

Pour l'évaluation des résultats, on se fonde :

a) sur le fait que le mélange substance à essayer/cellulose s'enflamme spontanément ou non

b) sur la comparaison du temps moyen de montée de 690 kPa à 2070 kPa (pression manométrique) avec le temps moyen obtenu pour la (les) substance(s) de référence.

Une substance liquide doit être considérée comme comburante lorsque :

a) un mélange 1 : 1, en poids, de la substance et de cellulose s'enflamme spontanément; ou

b) un mélange 1 : 1, en poids, de la substance et de cellulose présente un temps moyen de montée en pression inférieur ou égal au temps moyen de montée en pression d'un mélange 1 : 1, en poids, d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 65 % (poids/poids) et de cellulose.

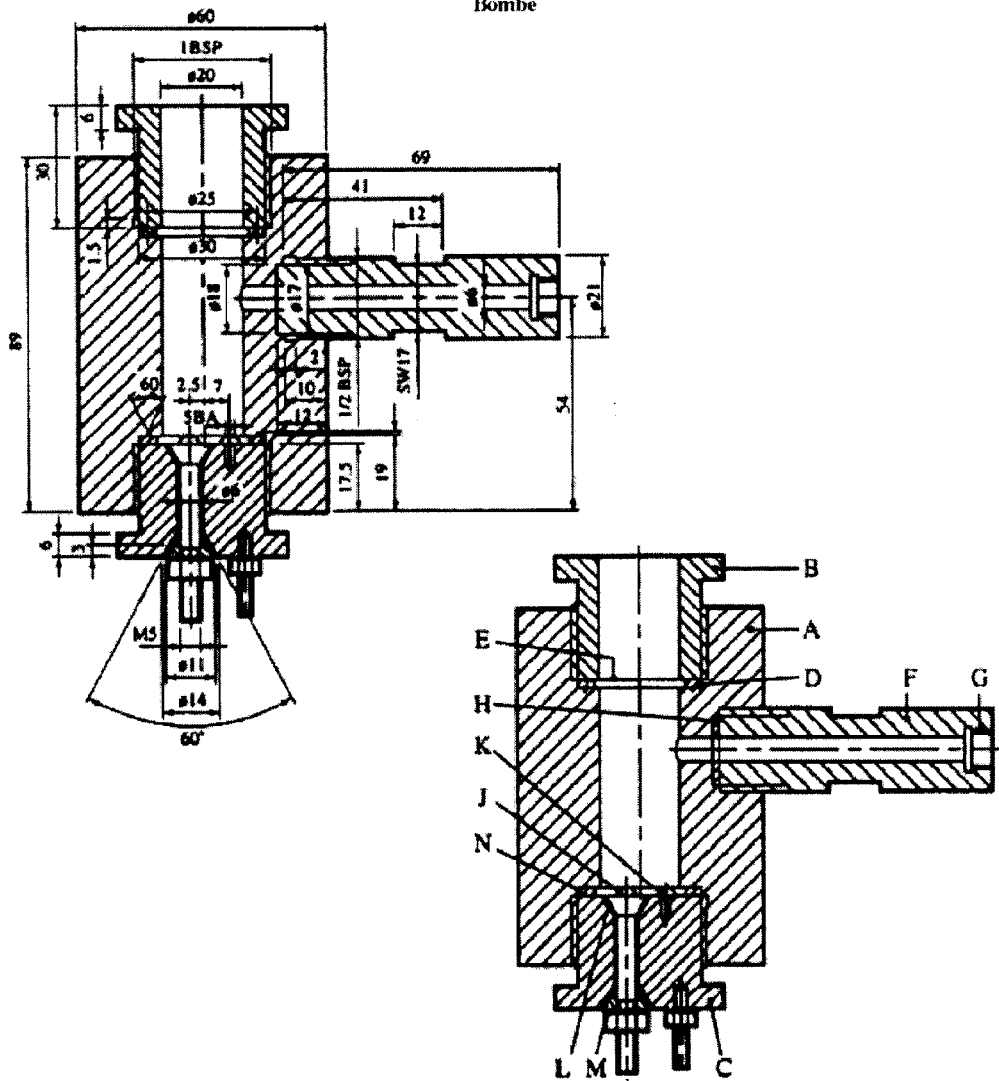
Afin d'éviter les faux positifs, il y a lieu, si nécessaire, de tenir également compte, lors de l'interprétation des résultats, des résultats obtenus dans les essais de la substance avec un matériel inerte.

4 REFERENCES

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No : ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2 : Test for oxidizing liquids.

Figure 1

Bombe



- | | | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|
| (A) Corps de la bombe | (B) Bouchon retenant le disque de rupture | (C) Bouchon de mise à feu |
| (D) Joint en plomb mou | (E) Disque de rupture | (F) Raccord de prise de pression |
| (G) Taraudage pour capteur de pression | (H) Joint | (J) Électrode isolée |
| (K) Électrode mise à la masse | (L) Isolation | (M) Cône en acier |
| (N) Rainure de matage du joint | | |

Figure 2

Porte-bombe

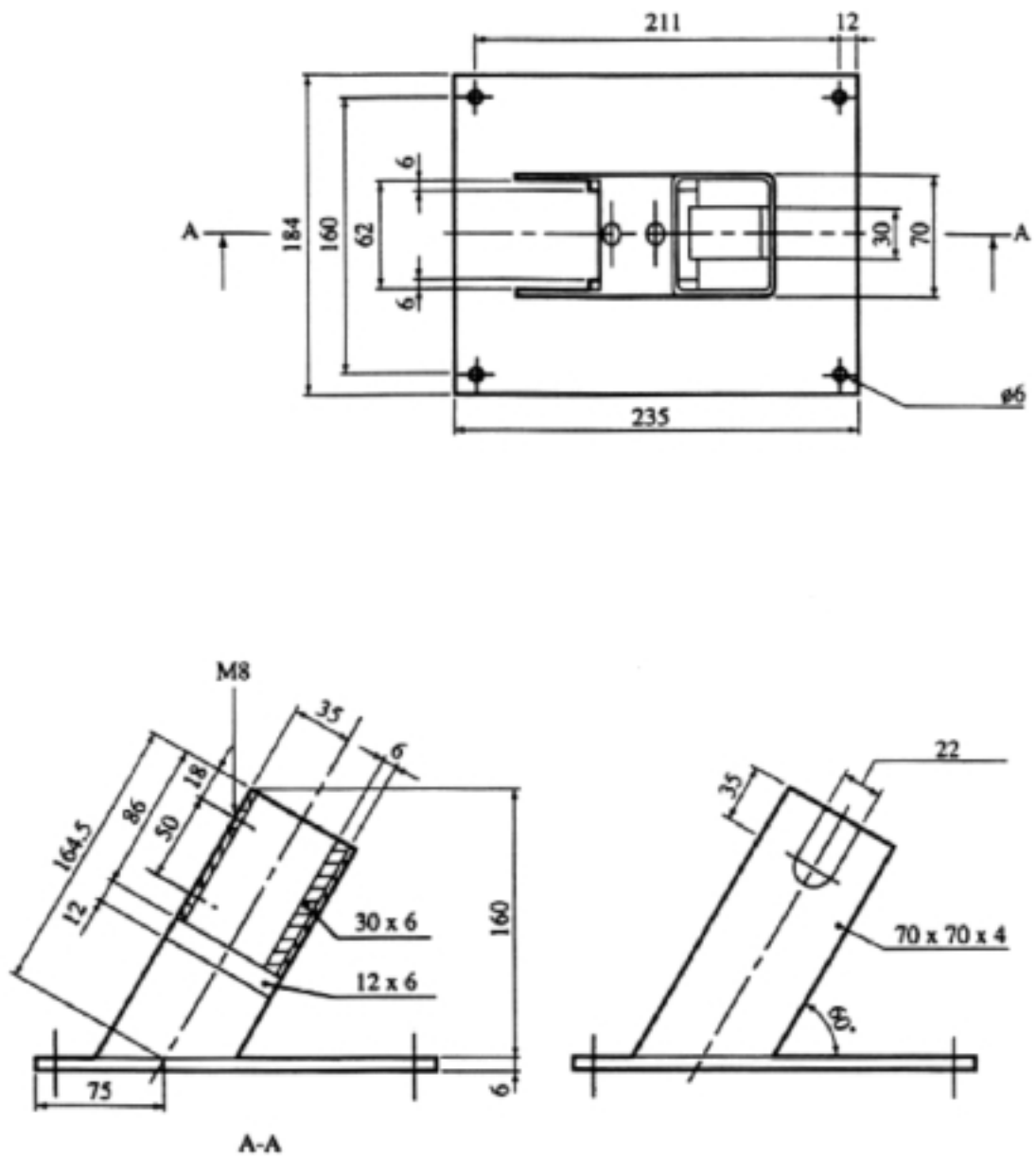
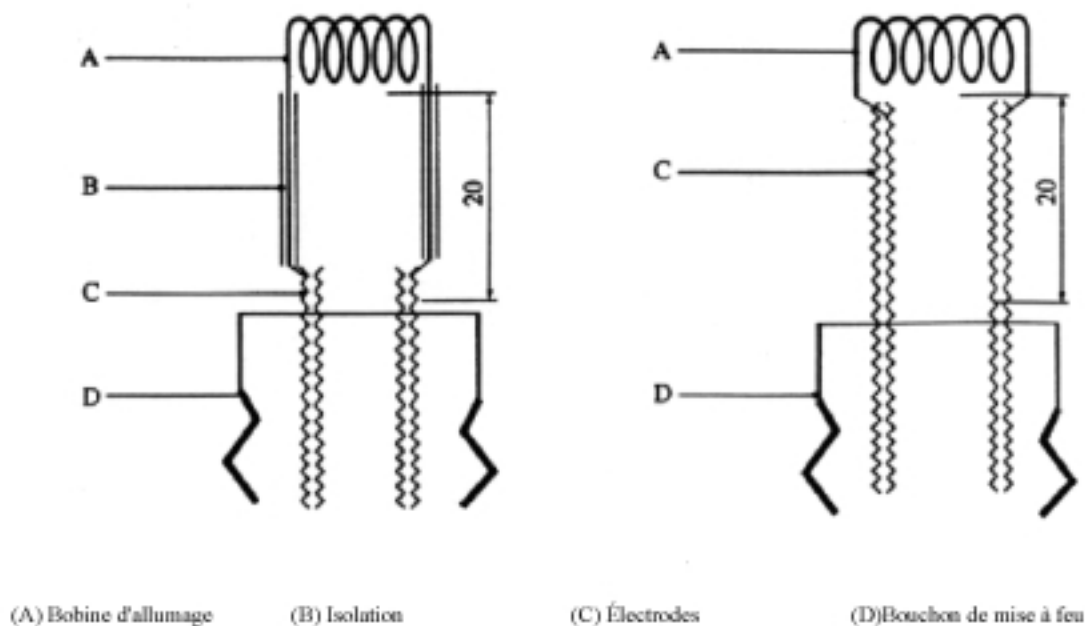


Figure 3

Système d'allumage



Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

»

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

Notes

¹Comme par exemple dans le cadre du règlement des Nations Unies sur les transports.

²L'acide doit être titré avant l'essai, afin de confirmer sa concentration.

³Par exemple : acide perchlorique à 50 % (poids/poids) et chlorate de sodium à 40 % (poids/poids) sont utilisés dans la référence 1.

⁴P.ex. Cellulose en poudre Whatman pour chromatographie sur colonne CF 11, n° de catalogue 4021 050.

⁵Confirmé par titrage Karl-Fisher par exemple

⁶On peut également obtenir cette teneur en eau, par exemple, en chauffant à 105 °C pendant 24 h sous vide

⁷Les mélanges de substances comburantes avec de la cellulose doivent être traités comme potentiellement explosifs et manipulés avec le plus grand soin

⁸Dans la pratique, cela peut être réalisé en préparant un mélange 1 : 1 du liquide à essayer et de cellulose en quantité plus importante que ce qui est nécessaire pour l'essai et en transférant $5 \pm 0,1$ g dans la bombe. Un nouveau mélange doit être préparé pour chaque essai.

⁹Il convient notamment d'éviter tout contact entre les spires adjacentes de la bobine.

¹⁰Voir la référence 1 pour l'interprétation des résultats des essais effectués selon le règlement des Nations unies sur le transport, qui utilisent plusieurs substances de référence.

Annexe 1B

« B.1 BIS. TOXICITE ORALE AIGUE - METHODE DE LA DOSE PREDETERMINEE

1. METHODE

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 420 (2001) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

Les méthodes traditionnelles pour évaluer la toxicité aiguë utilisent comme effet observé la mort des animaux. En 1984, la British Toxicology Society (BTS) a proposé une nouvelle approche pour les essais de toxicité aiguë, utilisant des doses prédéterminées (1). Cette méthode évitait d'utiliser la mort des animaux comme effet observé et s'appuyait plutôt sur l'observation de signes manifestes de toxicité apparaissant après traitement à une dose prédéterminée. Suite à des études de validation *in vivo* au Royaume-Uni (2) et au niveau international (3), cette procédure a été adoptée comme Ligne directrice en 1992. Après cela, les propriétés statistiques de la Méthode de la dose prédéterminée ont été évaluées dans une série d'études utilisant des modèles mathématiques (4) (5) (6). Ensemble, les études *in vivo* et celles basées sur des modèles mathématiques ont démontré que la procédure était reproductible et utilisait moins d'animaux auxquels elle occasionnait moins de souffrance que les méthodes traditionnelles. Elle permet de classer les substances par ordre de toxicité, de la même manière que les autres méthodes d'essai de toxicité aiguë.

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (7). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 bis.

La méthode de la dose prédéterminée a comme principe de n'utiliser, pour l'étude principale, que des doses modérément toxiques et d'éviter d'administrer des doses qui peuvent s'avérer létales. De même, il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider d'euthanasier les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste, ainsi que les orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (8).

La méthode fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement des substances selon le Système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (9).

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo*, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

1.2 DEFINITIONS

Toxicité orale aiguë : effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée : l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours

Dose : la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg).

Toxicité manifeste : terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai [voir (3)]. Ces signes doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de douleurs importantes et des signes persistants de détresse profonde, un état moribond [pour les critères voir (8)] et probablement de la mortalité pour la plupart des animaux.

SGH : Système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du Comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du B.I.T (communication des dangers) et coordonnée par IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente : il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Les signes indicatifs de cet état chez les rongeurs comprennent les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements. (voir (8) pour plus de détails).

DL₅₀ (dose létale 50 %) : dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL₅₀ est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite : désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

Etat moribond : désigne l'état précédant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails voir (8)].

Mort prévisible : présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple : incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails voir (8)].

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Des groupes d'animaux du même sexe reçoivent des doses prédéterminées de 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg selon une procédure séquentielle. Exceptionnellement une dose additionnelle de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir section 1.6.2). La dose initiale, choisie sur la base d'une étude d'orientation, est celle qui est susceptible de faire apparaître certains signes de toxicité, sans toutefois provoquer des effets toxiques graves ou la mort. Les manifestations cliniques et les effets associés à la douleur, la souffrance et une mort imminente sont décrites dans un Document d'orientation de l'OCDE (8). D'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou moins fortes en fonction de l'absence ou de la présence d'effets toxiques ou de mortalité. On continue la procédure jusqu'à ce que l'on identifie la dose qui occasionne un effet toxique évident ou la mort d'un seul animal. La procédure est également interrompue lorsque la dose la plus forte ne donne lieu à aucun effet observé ou lorsque la mort survient à la dose la plus faible.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Choix de l'espèce animale

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (7). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (10). Si toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2 Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local des animaux d'expérience doit être maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et rester de préférence inférieure à 70 pour cent, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

1.4.3 Préparation des animaux

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

1.4.4 Préparation des doses

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide qui peut être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5 MODE OPERATOIRE

1.5.1 Administration des doses

La substance d'essai est administrée en une seule dose par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou de toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeune, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2 ETUDE D'ORIENTATION

Le but de l'étude d'orientation est de permettre la sélection d'une dose initiale appropriée pour l'étude principale. L'administration des doses se fait de façon séquentielle aux animaux individuellement selon les schémas de l'Annexe 1. L'étude d'orientation prend fin lorsqu'une décision au sujet de la dose initiale de l'étude principale peut être prise (ou lorsqu'une mortalité est observée à la dose prédéterminée la plus faible).

Pour la dose initiale de l'étude d'orientation on choisit un niveau parmi les suivants : 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer des signes de toxicité évidente, si possible sur la base d'indications obtenues à partir de données *in vivo* et *in vitro* sur la même substance et sur des substances structurellement voisines. En l'absence de telles informations, la dose initiale sera de 300 mg/kg.

Les animaux sont traités à 24 heures d'intervalle au moins. Tous les animaux sont observés pendant au moins quatorze jours.

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir Annexe 3). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

Dans le cas où un animal ayant reçu la dose prédéterminée la plus faible (5 mg/kg) mourrait au cours de l'étude d'orientation, la procédure normale est de terminer l'étude et de classer la substance en catégorie 1 du SGH (voir l'Annexe 1). Cependant, il peut s'avérer nécessaire de confirmer la classification, et la procédure facultative supplémentaire ci-après est alors proposée. Un deuxième animal reçoit une dose de 5 mg/kg. Si ce deuxième animal meurt, la classification en catégorie 1 du SGH est confirmée et l'étude prend fin immédiatement. Si le deuxième animal survit, un maximum de trois animaux supplémentaires reçoivent chacun 5 mg/kg. Etant donné le risque de mortalité élevé, il convient de procéder de manière séquentielle par souci de protection des animaux. L'intervalle de temps entre chaque administration doit être suffisant afin de pouvoir démontrer que l'animal précédent a des chances de survivre. Si un deuxième animal meurt, l'administration séquentielle sera immédiatement arrêtée et aucun autre animal ne recevra de dose. Avec la mort d'un deuxième animal (indépendamment du nombre d'animaux soumis à l'essai au moment où celui-ci est arrêté), le résultat est A (2 morts ou plus), et la règle de classification présentée à l'annexe 2 pour la dose prédéterminée de 5 mg/kg s'applique : catégorie 1 s'il y a 2 morts ou plus, et catégorie 2 s'il y a seulement 1 mort. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

1.5.3 ETUDE PRINCIPALE

1.5.3.1 Nombre d'animaux et niveaux des doses

Les schémas de l'Annexe 2 indiquent la marche à suivre après administration de la dose initiale. Il y a trois possibilités : arrêter l'essai et attribuer la classification appropriée, administrer la dose prédéterminée supérieure ou administrer la dose inférieure. Cependant, par souci de protection des animaux, les doses ayant entraîné la mort au cours de l'étude d'orientation ne sont pas réappliquées lors de l'étude principale (voir annexe 2). L'expérience démontre que le résultat le plus probable à la dose initiale est que la substance pourra être classée et qu'il sera inutile de prolonger l'essai.

En général, on utilise au total cinq animaux du même sexe à chaque niveau de dose étudié. Ce groupe de cinq animaux est constitué de l'animal utilisé dans l'étude d'orientation, auquel est administrée la dose sélectionnée, et de quatre animaux supplémentaires (sauf dans les rares cas où une dose utilisée dans l'étude principale n'a pas été utilisée dans l'étude d'orientation).

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre. Un laps de temps de 3 ou 4 jours entre les administrations à chaque niveau de dose est recommandé, si nécessaire, pour permettre l'observation de signes de toxicité différée. Cet intervalle peut être ajusté selon qu'il convient, par exemple, en cas de réponse peu concluante.

Lorsque l'on envisage d'utiliser une dose prédéterminée maximale de 5 000 mg/kg, il y a lieu de suivre la procédure présentée à l'annexe 3 (voir également section 1.6.2).

1.5.3.2 Essai limite

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c-à-d que sa toxicité ne se manifeste qu'au delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Selon la procédure normale, une étude d'orientation à la dose initiale de 2 000 mg/kg (exceptionnellement 5 000 mg/kg), suivie du traitement de quatre animaux supplémentaires à cette même dose sert d'essai limite dans cette Ligne directrice.

1.6 OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire. Les moments où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent sont importants, surtout si les effets toxiques ont tendance à être différés (11). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le Document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (8). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1 Poids corporel

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

1.6.2 Pathologie

Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus après administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2 RESULTATS

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3 RAPPORT

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants :

Substance d'essai :

- état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation);
- données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant) :

- justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai :

- espèce/souche utilisée;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu;
- nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles);
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.;

Conditions de l'essai :

- détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré;
- détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau);
- justification du choix de la dose initiale.

Résultats :

- tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité, nature, gravité et durée des effets);
- tableau des poids corporels et des variations du poids;
- poids individuel des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, et au moment de la mort ou du sacrifice;
- date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice;
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle;
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques.

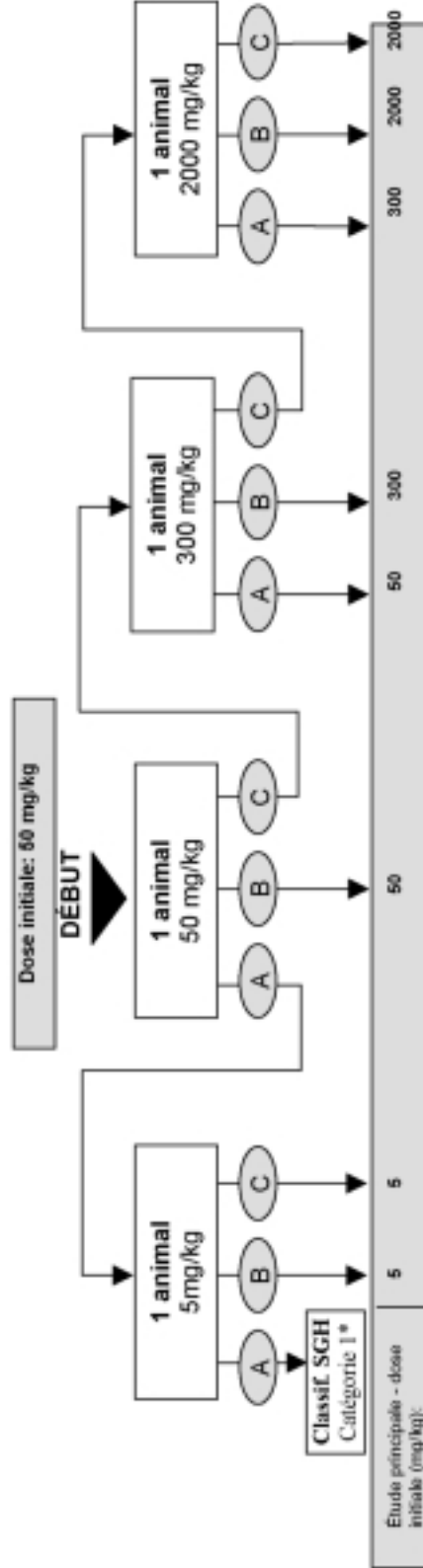
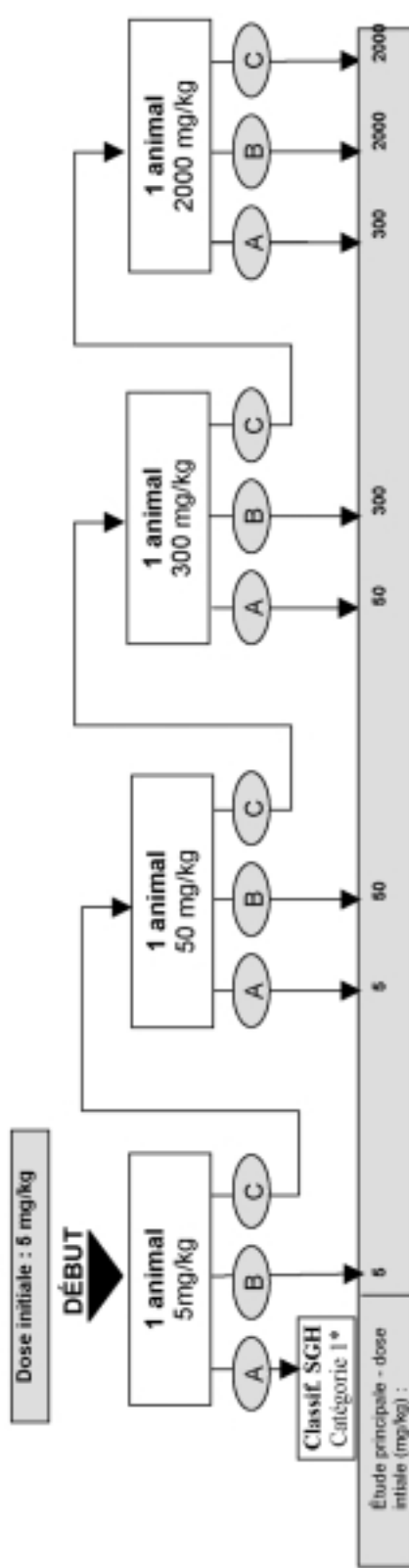
Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

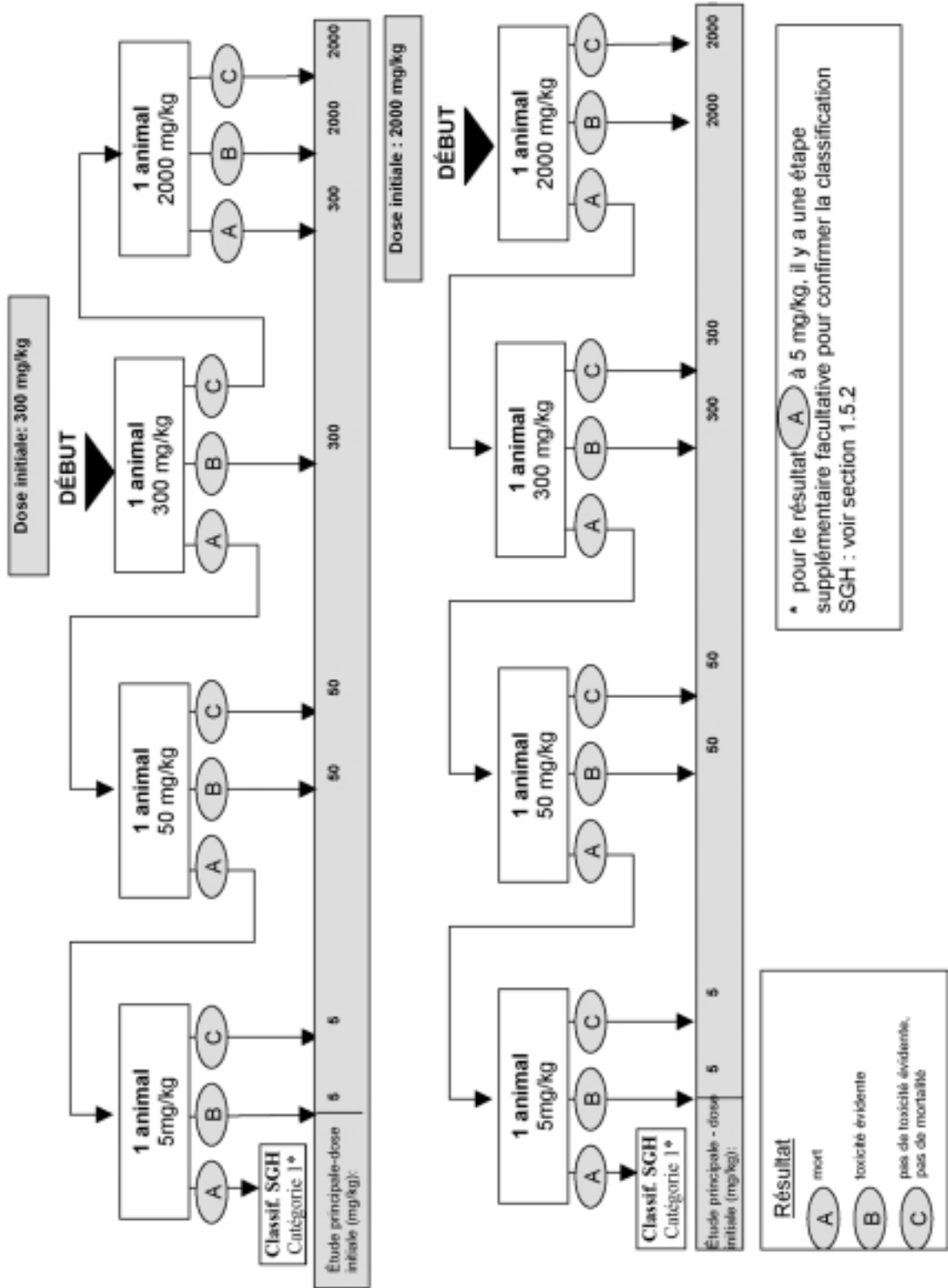
4 BIBLIOGRAPHIE

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report : a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469-482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323. *Human Exptl. Toxicol.*
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183 -196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.
- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.
- (11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation in : Principles and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

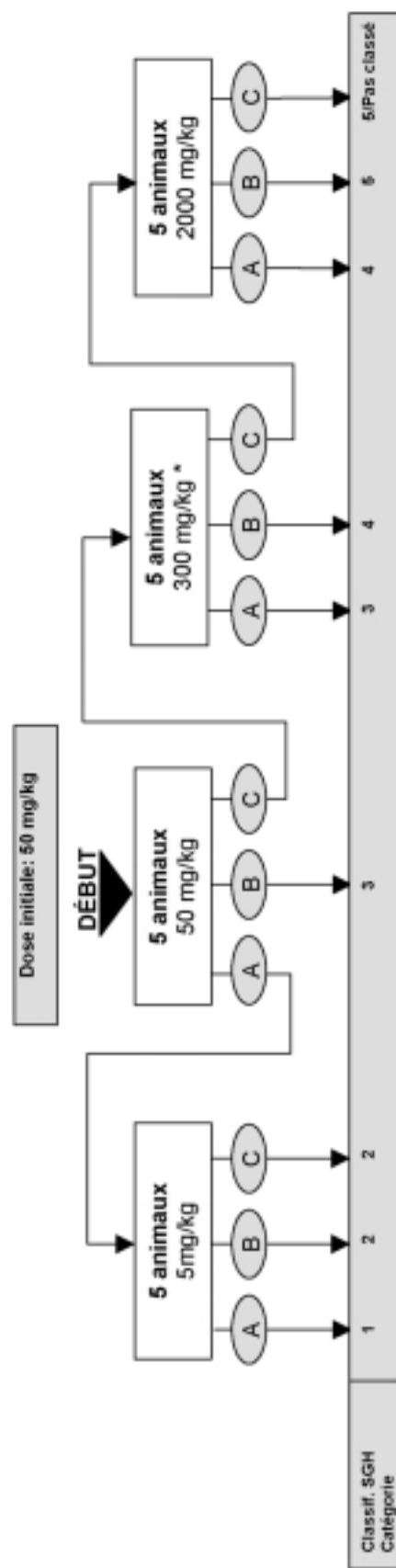
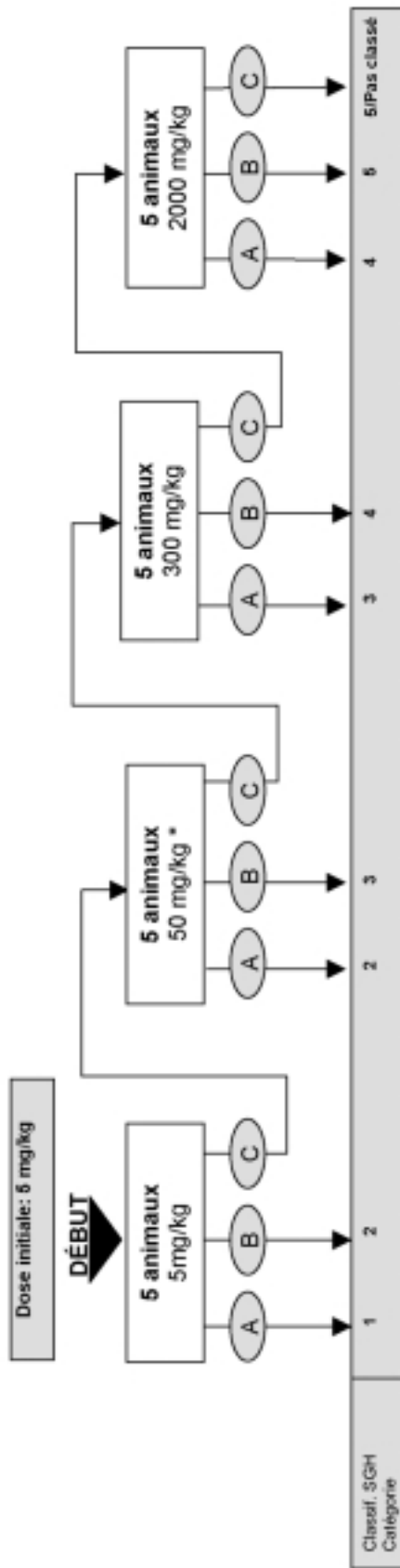
ANNEXE 1: SCHÉMA POUR L'ÉTUDE D'ORIENTATION



* pour le résultat **A** à 5 mg/kg, il y a une étape supplémentaire facultative pour confirmer la classification SGH: voir section 1.5.2.



ANNEXE 2: SCHEMA POUR L'ÉTUDE PRINCIPALE



Résultat

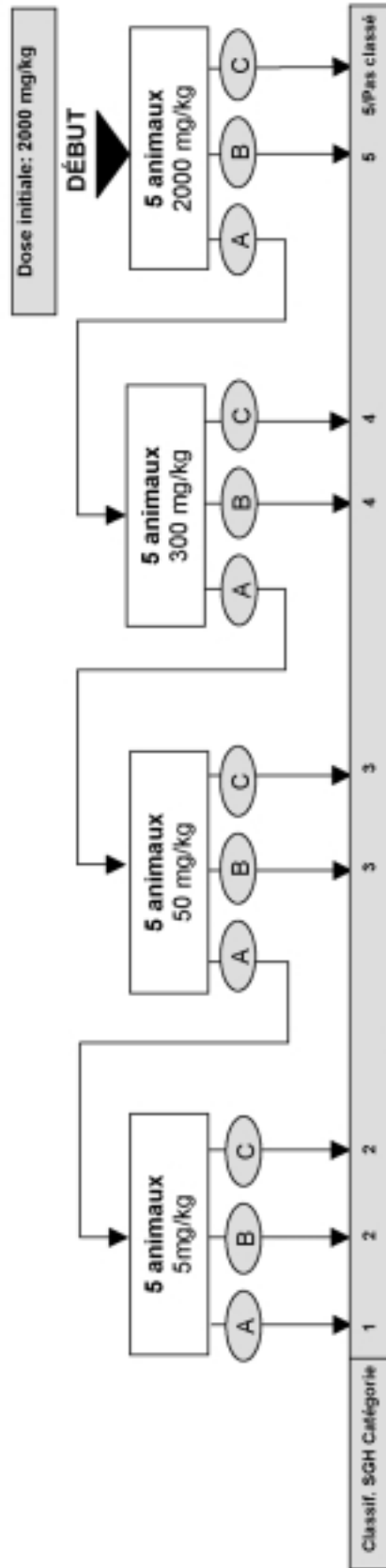
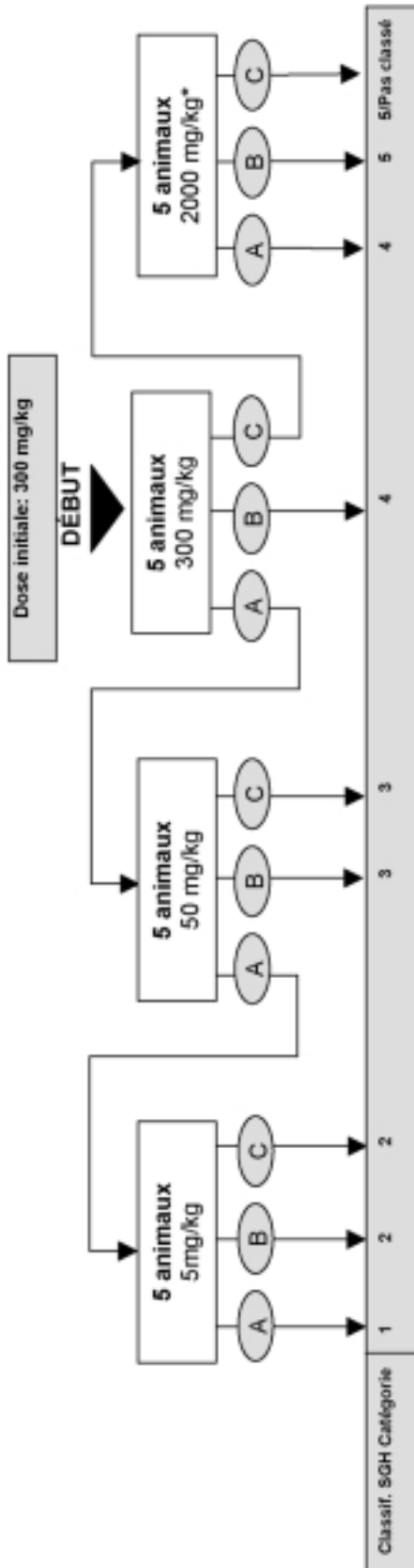
A ≥ 2 morts

B ≥ 1 avec toxicité évidente et/ou 1 mort

C Pas de toxicité, pas de mortalité

Taille du groupe
 Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation

***Prépondérance des considérations de protection des animaux**
 Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat A



Résultat

A ≥ 2 morts

B ≥ 1 avec toxicité évidente/ou 1 mort

C Pas de toxicité, pas de mortalité

Taille du groupe
 Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation

***Prépondérance des considérations de protection des animaux**
 Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat A

Annexe 3**CRITERES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI
DONT ON PRESUME QUE LA DL₅₀ EST SUPERIEURE A 2000 MG/KG, SANS RECOURIR A L'ESSAI**

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL₅₀ orale ou cutanée comprise dans la plage 2000-5000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par $2\ 000\ \text{mg/kg} < \text{DL}_{50} < 5\ 000\ \text{mg/kg}$, dans les cas suivants :

- a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas de l'Annexe 2 oriente la substance vers cette catégorie;
- b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL₅₀ se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;
- c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée et
 - il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou
 - une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
 - lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérississement des poils ou aspect mal soigné, ou
 - quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS A DOSES SUPERIEURES A 2 000 MG/KG

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée. Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (9).

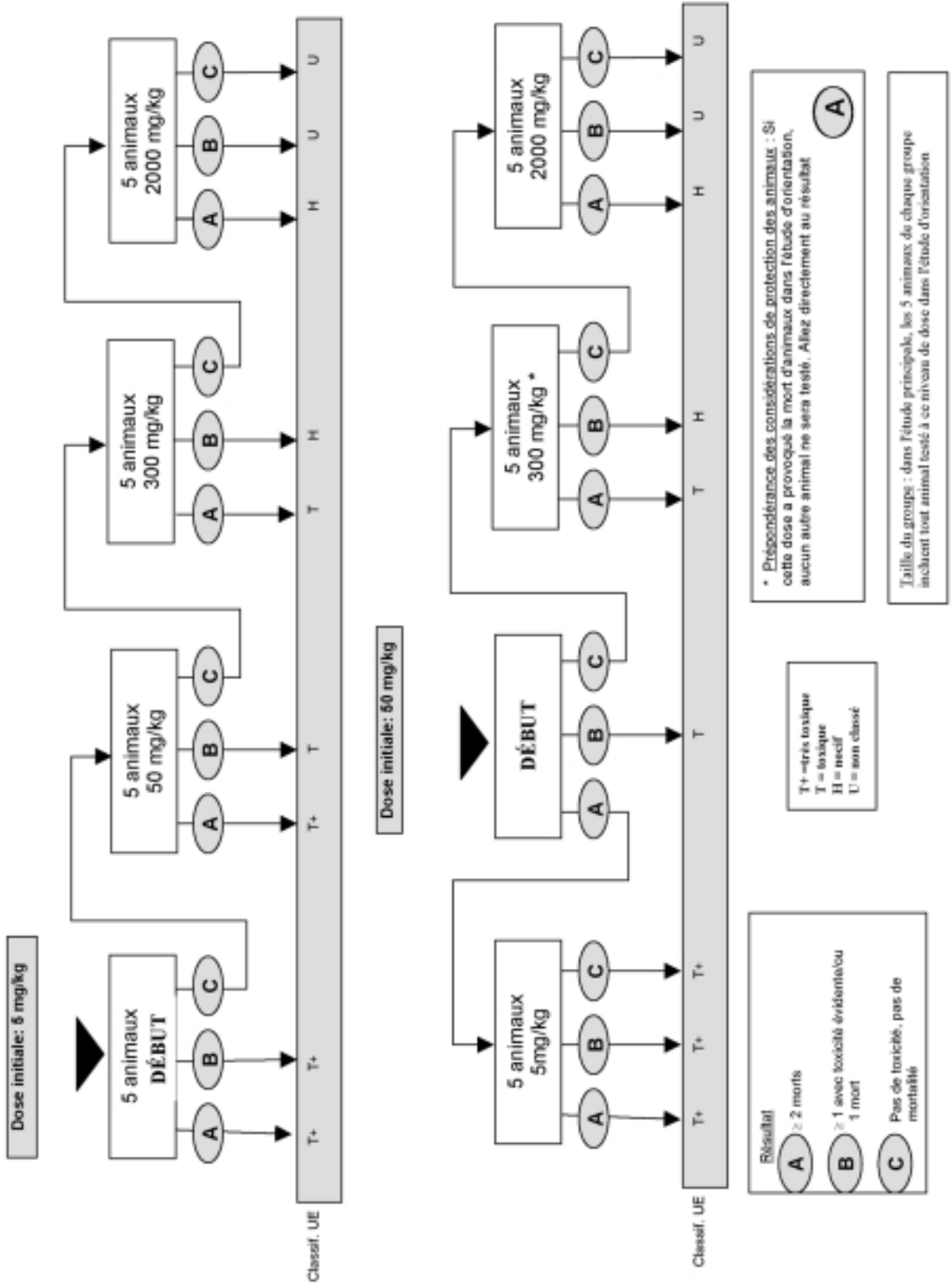
Etude d'orientation

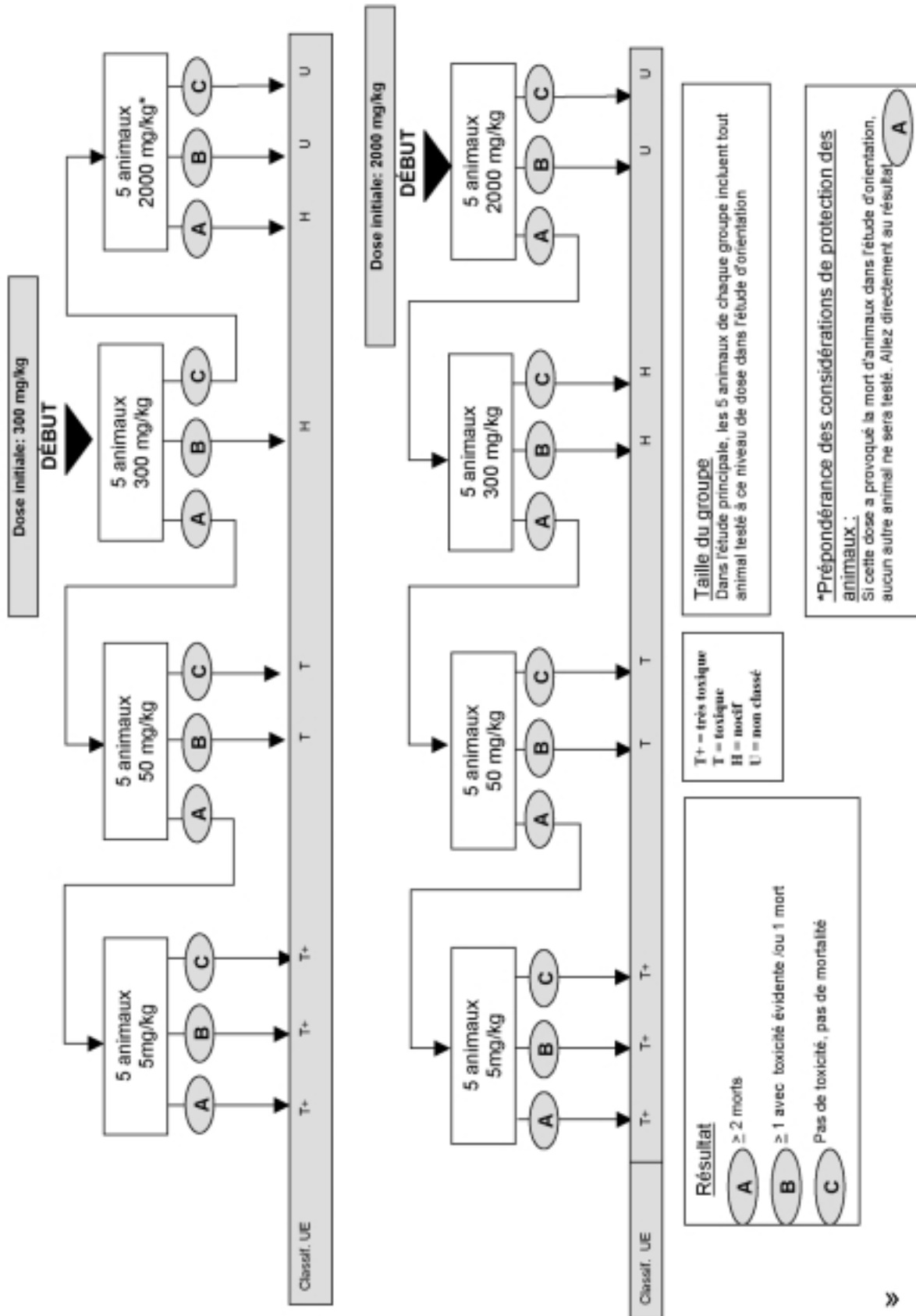
Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée en Annexe 1^{re} sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude d'orientation et que le résultat A (mortalité) est obtenu, il faut tester un deuxième animal à 2 000 mg/kg; si le premier résultat est B ou C (toxicité évidente ou pas de toxicité), on pourra choisir 5 000 mg/kg comme dose initiale dans l'étude principale. De même, si on choisit une dose initiale différente de 5 000 mg/kg, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat B ou C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg imposera une dose initiale de 2 000 mg/kg pour l'étude principale, alors qu'un résultat B ou C imposera 5 000 mg/kg comme dose initiale pour cette étude.

Etude principale

Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée en Annexe 2 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude principale et que le résultat A (≥ 2 morts) est obtenu, il faut tester un second groupe à 2 000 mg/kg; Si le premier résultat est B (toxicité évidente et/ou ≤ 1 mort) ou C (pas de toxicité), la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH. De façon similaire, si une dose initiale différente de 5 000 mg/kg est choisie, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg entraînera la classification de la substance dans la catégorie 5 du SGH; si le résultat obtenu est B ou C, la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH.

ANNEXE 4 :
MÉTHODE D'ESSAI B.1 bis – Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) (voir référence (8))





Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

Annexe 1C

« B.1 TRIS. TOXICITE ORALE AIGUE - METHODE DE LA CLASSE DE TOXICITE AIGUE

1. METHODE

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 423 (2001) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La méthode de la classe de toxicité aiguë (1) décrite dans cet essai est une procédure séquentielle qui utilise trois animaux de même sexe à chaque étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette procédure est reproductible, utilise très peu d'animaux et permet de classer des substances par ordre de toxicité de la même manière que les autres méthodes de toxicité aiguë. La méthode par classe de toxicité aiguë est basée sur des évaluations biométriques (2)(3)(4)(5) avec des doses prédéterminées, convenablement espacées de manière à permettre le classement des substances les unes par rapport aux autres aux fins de l'évaluation des dangers. La méthode, telle qu'elle a été adoptée en 1996, a été largement validée *in vivo* par rapport aux données de DL₅₀ issues de la littérature, tant sur le plan national (6) qu'international (7).

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (8). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1.tris.

Il n'est pas nécessaire d'administrer des substances d'essai à des niveaux de dose dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait des propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats, au même titre que les animaux morts pendant l'essai. Les critères pour décider de tuer les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (9).

La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances selon le Système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (10).

En principe, la méthode ne vise pas à calculer une valeur précise de DL₅₀, mais elle permet déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée comme létale, puisque la mort d'une partie des animaux reste le principal effet observé dans cet essai. La méthode permet de déterminer une DL₅₀ uniquement dans le cas où au moins deux doses donnent une mortalité supérieure à 0 % et inférieure à 100 %. Grâce à l'utilisation d'un choix de doses prédéterminées, indépendamment de la substance d'essai, et au lien explicite entre classification et nombre d'animaux dans différents états observés, la cohérence entre laboratoires est favorisée.

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, le résultat de tout autre essai de toxicité réalisé *in vivo* ou *in vitro* sur la substance, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

1.2 DEFINITIONS

Toxicité orale aiguë : effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée : l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours

Dose : la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg).

SGH : Système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du Comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du B.I.T (communication des dangers) et coordonnée par IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente : il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [pour de plus amples détails voir (9)].

DL₅₀ (dose orale létale 50 %) : dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL₅₀ est exprimée en poids de la substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite : désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

Etat moribond : l'état avant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails voir (9)].

Mort prévisible : présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple : incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails voir (9)].

1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel et un nombre minimal d'animaux par étape, il est possible d'obtenir des informations sur la toxicité aiguë de la substance d'essai qui sont suffisantes aux fins de sa classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée selon une procédure séquentielle utilisant trois animaux de même sexe (généralement des femelles) à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure à trois animaux supplémentaires.

Des détails concernant le mode opératoire sont décrits en Annexe 1. La méthode permet de se prononcer sur la classification de la substance d'essai dans une classe de toxicité délimitée par des valeurs préalablement fixées de DL_{50} .

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE

1.4.1 Choix de l'espèce animale

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (9). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} montre en effet qu'il y a peu de différence de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a des différences, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (11). Si toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains, issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2 Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local des animaux d'expérience doit être de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et rester de préférence inférieure à 70 pour cent, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

1.4.3 Préparation des animaux

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

1.4.4 Préparation des doses

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5 MODE OPERATOIRE

1.5.1 Administration des doses

La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2 Nombre d'animaux et niveaux des doses

Trois animaux sont utilisés à chaque étape. Pour la dose initiale, on choisit un niveau parmi les quatre suivants : 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg de poids corporel. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer une mortalité chez les animaux traités. Les schémas de l'Annexe 1 décrivent la marche à suivre pour chacune des doses initiales. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

Lorsque certaines informations donnent à penser qu'il est peu probable que la dose initiale la plus élevée (2 000 mg/kg de poids corporel) provoque une mortalité, il convient de procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée par souci de protection des animaux est 300 mg/kg de poids corporel.

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre.

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir Annexe 2). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement

1.5.3 Essai limite

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c-à-d que sa toxicité ne se manifeste qu'au delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Un essai limite à la dose de 2 000 mg/kg peut être effectué sur six animaux (trois animaux par étape). Exceptionnellement, un essai limite à la dose de 5 000 mg/kg peut être réalisé sur trois animaux (voir Annexe 2). Si une mortalité liée à la substance est observée, il peut s'avérer nécessaire de poursuivre l'essai à la dose immédiatement inférieure.

1.6 OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire. Les moments où apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, particulièrement quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes (12) Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le Document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (9). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1 Poids corporel

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai, et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

1.6.2 Pathologie

Tous les animaux (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. RESULTATS

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. RAPPORT

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants :

Substance d'essai :

- état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation);
- données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant) :

- justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai :

- espèce/souche utilisée;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu;
- nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles);
- origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.;

Conditions de l'essai :

- détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré;
- détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau);
- justification du choix de la dose initiale.

Résultats :

- tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité; nature, gravité et durée des effets);
- tableau des poids corporels et des variations du poids;
- poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, ainsi qu'au moment de la mort ou du sacrifice;
- date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice;
- pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle;
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques le cas échéant.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4 BIBLIOGRAPHIE

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett.*, Suppl. 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559-610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods : Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, 129-134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA. »

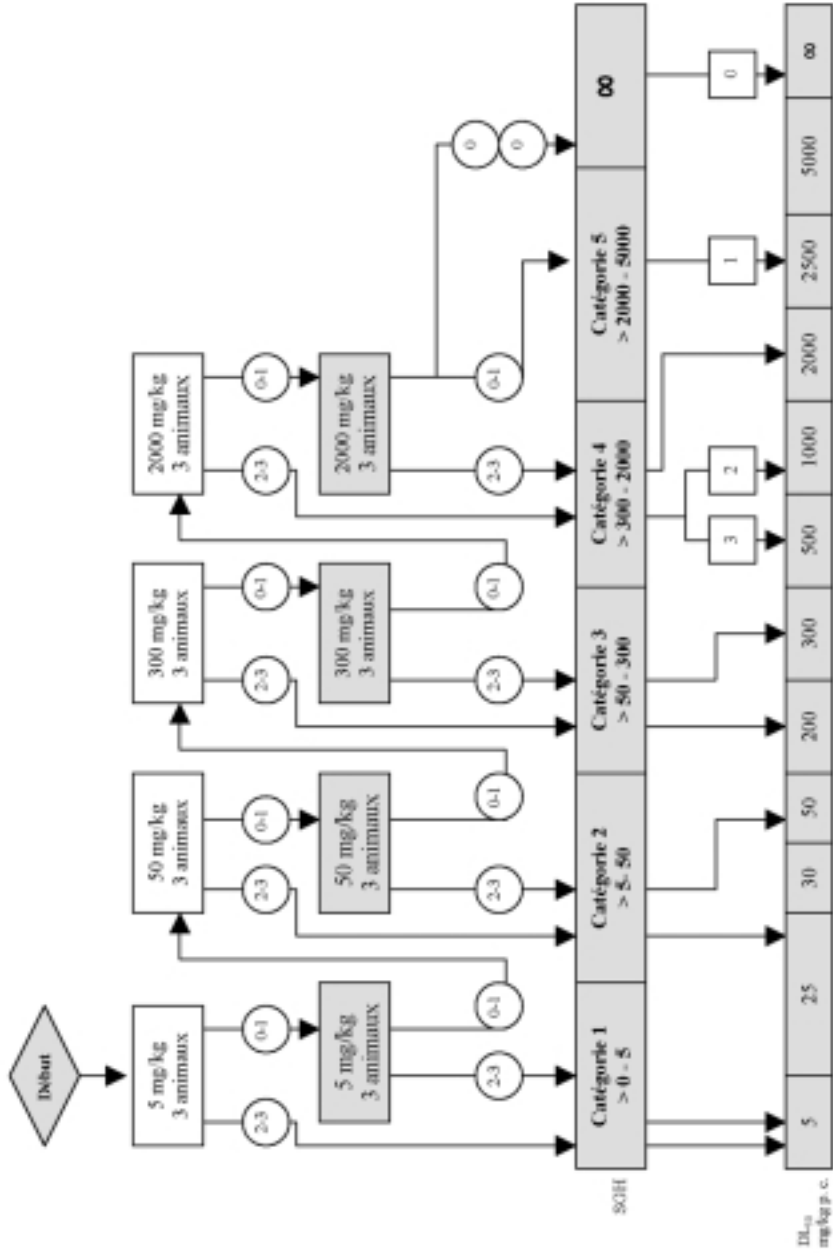
Annexe 1^{re}
MARCHE A SUIVRE POUR CHACUNE DES DOSES INITIALES**REMARQUES GENERALES**

Les divers schémas d'essai présentés dans la présente annexe indiquent la marche à suivre pour chaque dose initiale.

- Annexe 1 A : dose initiale de 5 mg/kg de poids corporel
- Annexe 1 B : dose initiale de 50 mg/kg de poids corporel
- Annexe 1 C : dose initiale de 300 mg/kg de poids corporel
- Annexe 1 D : dose initiale de 2 000 mg/kg de poids corporel

En fonction du nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés, la marche à suivre est indiquée par les flèches.

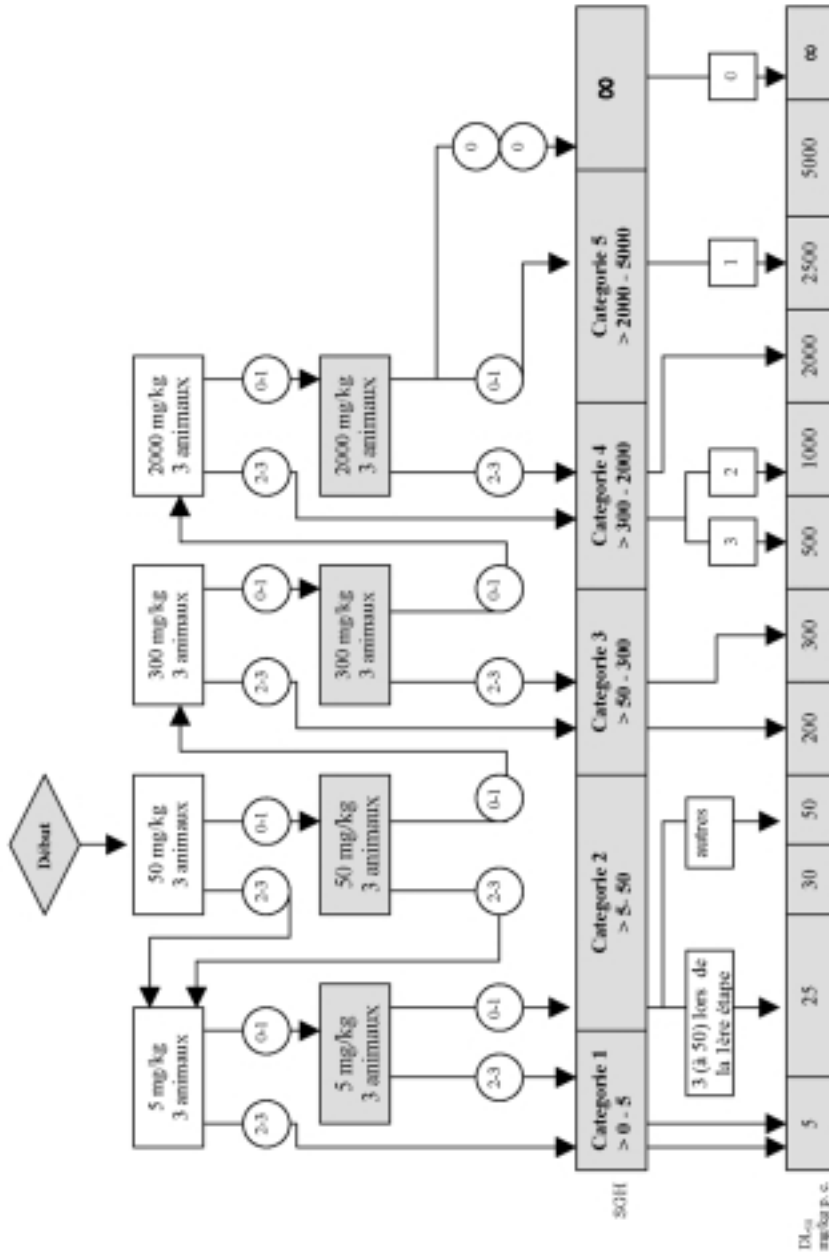
ANNEXE I A
MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 5 MG/KG DE POIDS CORPOREL



∞: non classé
 - - : essai à 5000 mg/kg p.c.; voir annexe 2

- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
 - 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
 - SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p.c.)

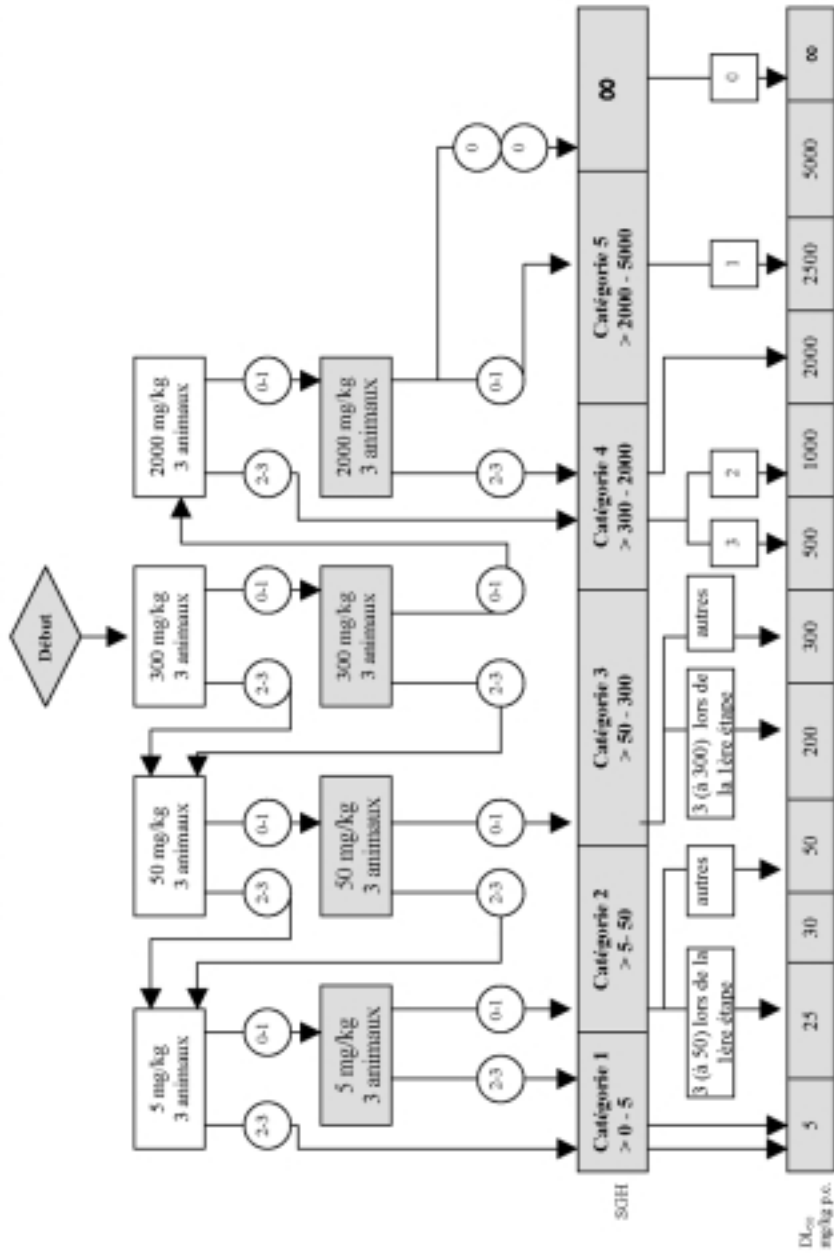
ANNEXE IB
MODE OPÉRATEUR POUR UNE DOSE INITIALE DE 50 MG/KG DE POIDS CORPOREL



- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p.c.)

- ∞: non classé
- - essai à 5000 mg/kg p.c.: voir annexe 2

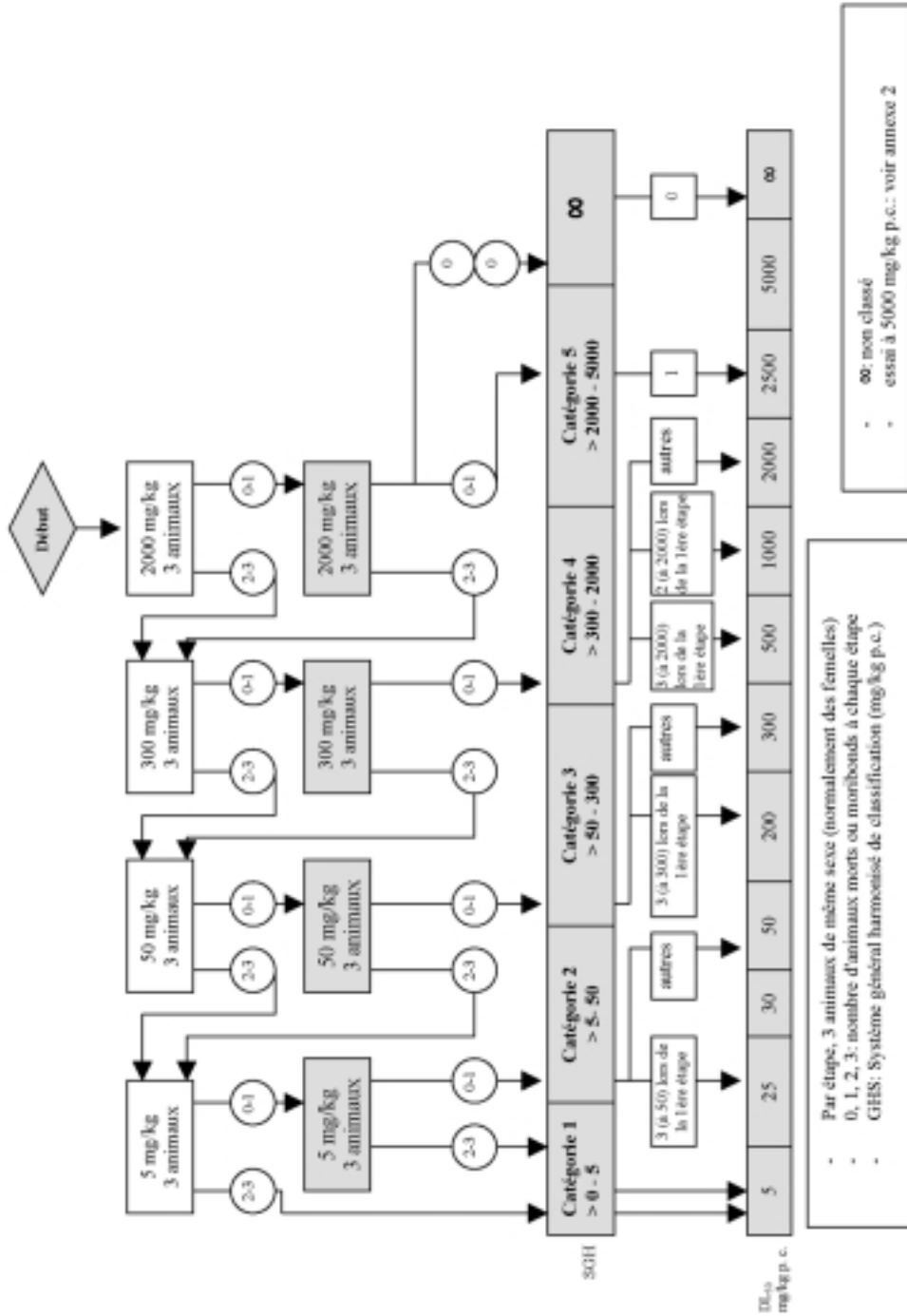
ANNEXE IC
MODE OPÉRATEUR POUR UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG DE POIDS CORPOREL



- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
 - 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
 - SCGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p.c.)

- ∅: non classé
 - - essai à 5000 mg/kg p.c.: voir annexe 2

ANNEXE I D
MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 2000 MG/KG DE POIDS CORPOREL



- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
 - 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
 - GHES: Système général harmonisé de classification (mg/kg p.c.)

Annexe 2

**CRITERES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI
DONT ON PRESUME QUE LA DL₅₀ EST SUPERIEURE A 2000 MG/KG, SANS RECOURIR A L'ESSAI**

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL₅₀ orale ou cutanée comprise dans la plage 2000-5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Les substances d'essai devraient être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par $2\,000\text{ mg/kg} < DL_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$, dans les cas suivants :

a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas des annexes 1A à 1D oriente la substance vers cette catégorie;

b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL₅₀ se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée et

- il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou
- une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
- lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissément des poils ou aspect mal soigné, ou
- quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

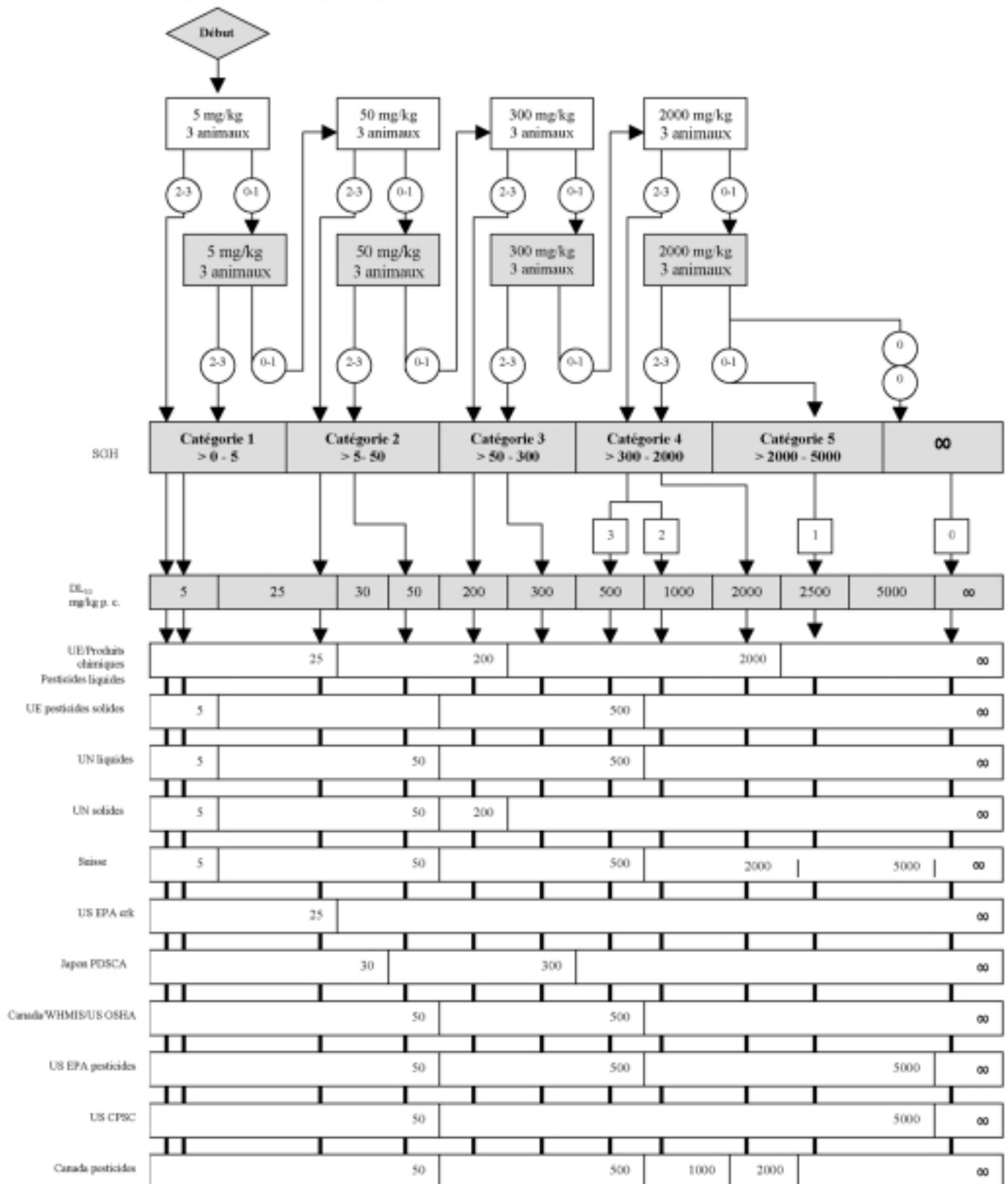
ESSAIS A DOSES SUPERIEURES A 2 000 MG/KG

Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (10). Aucun essai ne doit être effectué à des doses plus élevées.

Lorsqu'un essai à 5 000 mg/kg est nécessaire, une seule étape suffit (c-à-d trois animaux). Si le premier animal traité meurt, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg comme indiqué dans les schémas de l'annexe 1. Si le premier animal traité survit, deux autres animaux sont traités. Si un seul des trois animaux meurt, la DL₅₀ est présumée supérieure à 5 000 mg/kg. Si les deux animaux meurent, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg.

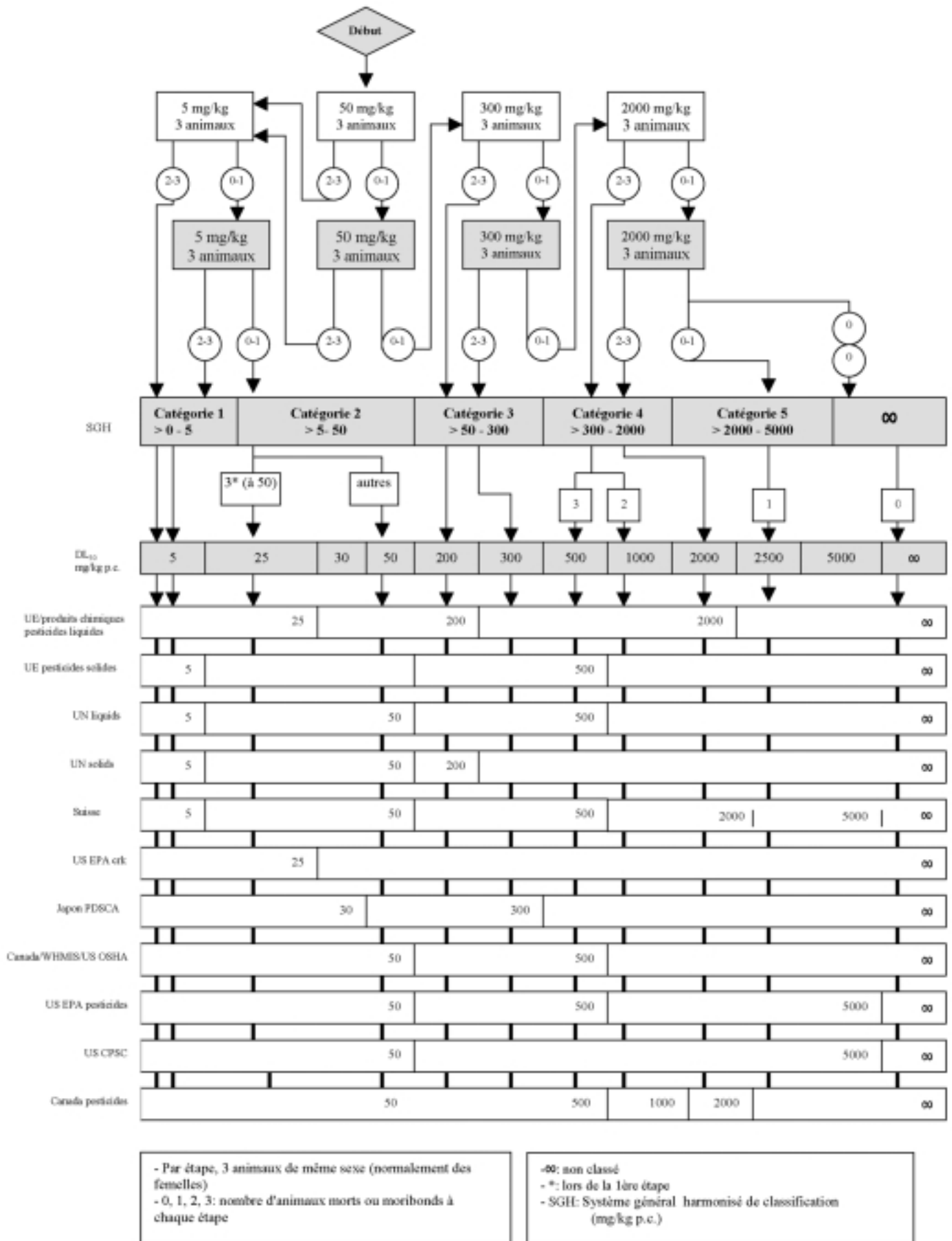
ANNEXE 3

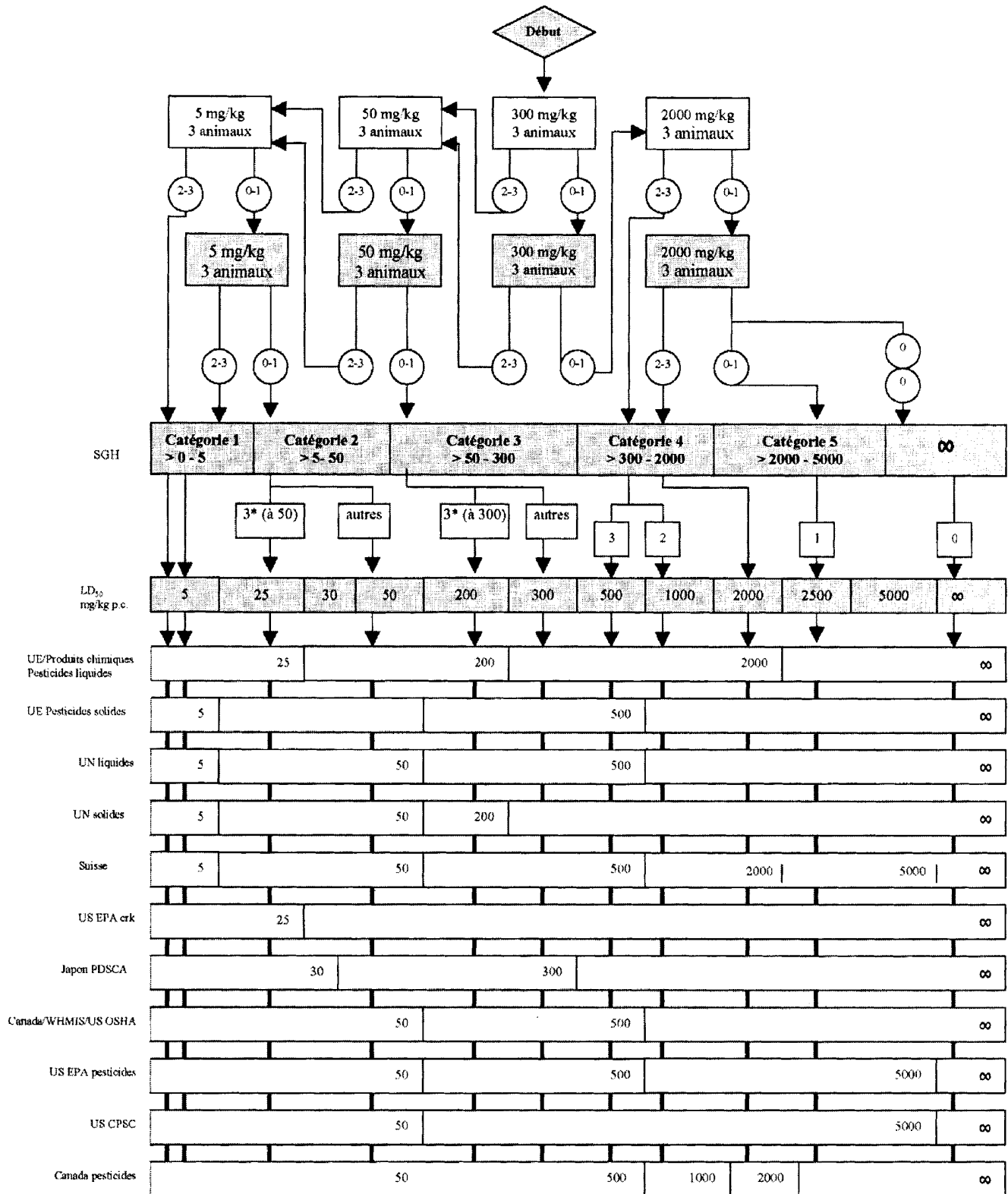
MÉTHODE D'ESSAI B.1 tris : Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) (voir référence (8))



- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape

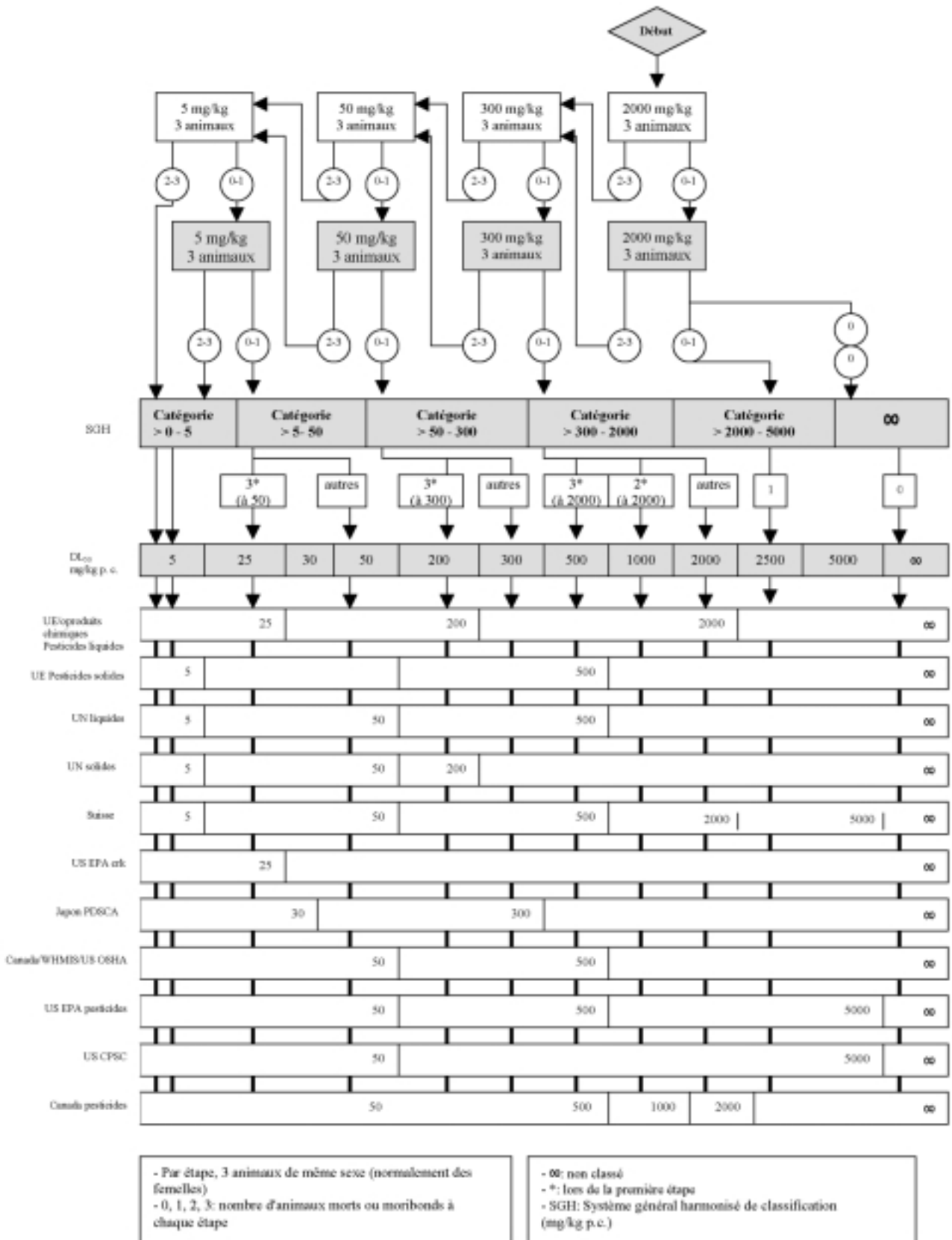
- ∞: non classé
- SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p.c.)





- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
 - 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape

- ∞ non classé
 - *: lors de la 1ère étape
 - SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p.c.)



Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
 R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
 B. TOBACK

Annexe 1D

« B. 4. TOXICITE AIGUE : IRRITATION/CORROSION CUTANEE

1. METHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 404 (2002) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La mise à jour de cette méthode a porté plus particulièrement sur les possibilités d'améliorer le traitement des animaux de laboratoire et sur l'évaluation de toutes les informations existantes se rapportant aux substances d'essai en vue d'éviter les tests inutiles sur animaux. La présente méthode recommande d'analyser la valeur probante des résultats pertinents déjà disponibles avant de procéder à l'essai *in vivo* de corrosion/irritation décrit ci-après. Les données manquantes pourront être comblées par des essais séquentiels (1). La démarche expérimentale, décrite en annexe, inclut la réalisation d'essais *in vitro* validés et acceptés. Il est également recommandé d'opter, le cas échéant, pour une application successive plutôt que simultanée des trois timbres sur l'animal dans l'essai *in vivo* initial.

Pour assurer à la fois la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* tant que la valeur probante de toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau de la substance n'aura pas été analysée. Ces données comprendront les résultats d'études menées sur des humains et/ou des animaux, des données relatives à l'effet corrosif ou irritant d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (2) (3), et des résultats d'essais *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés (4) (5) (5a). Cette analyse devrait réduire la nécessité de tester *in vivo* l'effet corrosif ou irritant sur la peau des substances pour lesquelles des études antérieures ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects.

La démarche expérimentale préconisée, de type séquentiel, comporte des essais de corrosion et d'irritation *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés, et est décrite dans l'annexe de la présente méthode. Cette démarche, élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (6) et recommandée à l'unanimité par les participants à cet atelier a été adoptée à titre de recommandation dans le cadre du Globally Harmonized System for the Classification of Chemical Substances (GHS) [Système de classification des substances chimiques harmonisé à l'échelon mondial] (7). Bien que cette stratégie séquentielle ne fasse pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée avant d'entreprendre les essais *in vivo*. S'agissant de nouvelles substances, on préconise de suivre une démarche expérimentale par étapes pour obtenir des résultats scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant de la substance. En ce qui concerne les substances existantes dont les données sur l'effet corrosif ou irritant sont insuffisantes, on suppléera à ces dernières en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre démarche expérimentale ou la décision de ne pas procéder par étapes doivent être justifiés.

Si l'analyse de la valeur probante des résultats ne permet pas de déterminer l'effet corrosif ou irritant, on envisagera un essai *in vivo* compatible avec la démarche séquentielle (voir annexe).

1.2 DEFINITIONS

L'**irritation cutanée** désigne l'apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'une substance d'essai durant une période de quatre heures au maximum.

La **corrosion cutanée** désigne la survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'une substance d'essai durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au pâlissement de la peau, des zones d'alopécie totale et des escarres. Un examen histopathologique sera envisagé en cas de lésions douteuses.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Une seule dose de la substance d'essai est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleur aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation de la substance. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrant fortement sont définis dans un document cité en référence (8).

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Préparation de l'essai *in vivo*

1.4.1.1 Sélection de l'espèce animale

On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

1.4.1.2 Préparation des animaux

Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

La fourrure de certaines souches de lapins est plus touffue par endroits et ce phénomène est plus marqué à certaines périodes de l'année. Ces plages à forte pilosité ne doivent pas recevoir la substance d'essai.

1.4.1.3 Conditions d'hébergement et d'alimentation

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (± 3 °C) pour les lapins. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et rester de préférence inférieure à 70 pour cent, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

1.4.2 Mode opératoire

1.4.2.1 Application de la substance d'essai

La substance d'essai est appliquée sur une petite zone (environ 6 cm²) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, maintenue en place à l'aide d'un sparadrap non irritant. Si l'application directe est impossible (dans le cas de liquides ou de certaines pâtes, par exemple), la substance d'essai est d'abord appliquée sur la compresse de gaze, laquelle est ensuite placée sur la peau. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un

pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. Si la substance d'essai est déposée sur la compresse, celle-ci doit être fixée sur la peau de façon à ce que la substance y soit répartie uniformément et entre bien en contact avec elle. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler la substance d'essai.

Les substances liquides sont généralement testées à l'état non dilué. Si la substance d'essai est solide (elle peut être pulvérisée si nécessaire), il y a lieu de l'humidifier avec la plus petite quantité d'eau (ou au besoin d'un autre véhicule approprié) nécessaire à assurer un bon contact avec la peau. Lorsqu'on utilise un véhicule autre que l'eau, l'influence éventuelle du véhicule sur l'irritation de la peau par la substance d'essai doit être minimale.

A la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être de la substance d'essai restante, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme.

1.4.2.2 Dose

Une dose de 0,5 ml de liquide ou de 0,5 g de solide ou de pâte est appliquée sur la plage à tester.

1.4.2.3 Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée *in vivo* sur un seul animal)

Il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai *in vivo* sur un seul animal, surtout lorsqu'on pense que la substance risque d'être corrosive. Cette précaution obéit à la démarche expérimentale séquentielle (voir annexe 1).

Dès lors qu'une substance est jugée corrosive d'après l'analyse de la valeur probante des résultats, tout essai sur animal s'avère superflu. Pour la plupart des substances risquant d'être corrosives, il n'est généralement pas nécessaire de procéder à un essai *in vivo*. Toutefois, si l'on estime que les données disponibles ne sont pas assez convaincantes, on peut réaliser un essai limité sur un animal en suivant la procédure décrite ci-après. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction.

Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

Dans les cas où l'on s'attend à ce que la substance d'essai soit peut-être irritante, mais pas corrosive, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

1.4.2.4 Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée *in vivo* sur des animaux supplémentaires)

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

1.4.2.5 Période d'observation

La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

1.4.2.6 Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

L'observation des signes d'érythème et d'œdème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau ci-après. Si la peau présente des lésions qui ne caractérisent pas une irritation ou une corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels qu'un dessèchement de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple, des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. L'examen histopathologique est à envisager en cas de réactions équivoques.

La cotation des réactions cutanées est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions cutanées et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé (voir tableau ci-après). Un manuel illustré sur la cotation de l'irritation cutanée et d'autres lésions pourrait être utile (9). La cotation des réactions cutanées devrait faire l'objet d'une évaluation à l'aveugle.

2. RESULTATS

2.1 PRESENTATION DES RESULTATS

Les résultats de l'étude devraient être récapitulés dans un tableau joint au rapport d'essai final et couvrir tous les aspects énumérés au paragraphe 3.1.

2.2 EVALUATION DES RESULTATS

Le degré d'irritation cutanée devrait être évalué en considération de la gravité des lésions et de leur caractère réversible ou non. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. Ces cotes individuelles doivent plutôt être considérées comme des valeurs de référence, à évaluer en association avec toutes les autres observations effectuées au cours de l'étude.

L'évaluation des réactions d'irritation doit tenir compte de la réversibilité des lésions cutanées. Si des réactions, telles qu'une alopecie (sur une aire limitée), une hyperkératose, une hyperplasie et une desquamation, persistent jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours, il y a lieu de considérer la substance d'essai comme irritante.

3. RAPPORT

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Justification de l'essai *in vivo* : analyse de la valeur probante des résultats disponibles avant l'essai, notamment des résultats de la démarche expérimentale séquentielle :

- description des données pertinentes livrées par des essais précédents;
- données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale;
- description des essais *in vitro* effectués, exposant le détail des procédures et les résultats obtenus avec les substances d'essai et de référence;
- justification de l'étude *in vivo* après analyse de la valeur probante des résultats disponibles.

Substance d'essai :

- données d'identification (par exemple, numéro CAS, source, pureté, impuretés connues, numéro de lot);
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité);
- s'il s'agit d'un mélange : composition et pourcentages relatifs des constituants.

Véhicule :

- identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;
- nombre d'animaux de chaque sexe;
- poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;
- âge des animaux au début de l'essai;
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions expérimentales :

- technique de préparation du site d'application;
- détails concernant la composition du timbre et la technique d'application de ce dernier;
- détails sur la préparation, l'application et l'enlèvement de la substance d'essai.

Résultats :

- tableau faisant apparaître, pour chaque animal et à chaque relevé, les cotes attribuées aux réactions d'irritation/corrosion observées;
- description de toutes les lésions observées;
- description circonstanciée de la nature et du degré d'irritation ou de corrosion observé, et de tout effet histopathologique;
- description de tout autre effet local néfaste (par exemple, dessèchement de la peau) et des effets systémiques.

Discussion des résultats

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutton, F.A.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410- 429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483 - 524.
- (5a) Méthode d'essai B.40 Corrosion cutanée
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme : Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[peut être obtenu sur demande auprès du Secrétariat de l'OCDE].

TABLEAU I : COTATION DES REACTIONS CUTANÉES

Formation d'érythème et d'escarres

Pas d'érythème	0
Erythème très léger (à peine perceptible)	1
Erythème bien défini	2
Erythème modéré à grave	3
Erythème grave (rouge violacé) à formation d'escarres empêchant la cotation de l'érythème	4

Maximum possible : 4

Formation d'œdème

Pas d'œdème	0
Œdème très léger (à peine perceptible)	1
Œdème léger (pourtour de la zone œdémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4

Maximum possible : 4

Un examen histopathologique pourra être réalisé en cas de réaction équivoque.

Annexe**Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées****CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES**

Si cette démarche expérimentale séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur la peau. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai *in vivo* et récapitule les facteurs à prendre en considération avant d'entamer l'essai. La démarche indique comment évaluer les données existantes relatives aux propriétés irritantes ou corrosives des substances et présente les différentes étapes permettant d'obtenir des données pertinentes sur les substances qui réclament d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiées. Elle recommande également, dans certaines circonstances, la réalisation d'essais *in vitro* ou *ex vivo* d'irritation et de corrosion cutanées, validés et acceptés.

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation inutile d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai *in vivo*, on évaluera toutes les informations relatives à l'éventuel pouvoir corrosif/irritant d'une substance sur la peau. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer une substance d'essai quant à son pouvoir irritant ou corrosif, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à une analyse de la valeur probante des résultats et l'adoption d'une démarche expérimentale séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais *in vivo*, surtout lorsqu'il est probable que la substance va engendrer de graves effets.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des substances à l'aide d'une analyse de la valeur probante des résultats, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études cutanées *in vivo*, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales pertinentes. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La démarche expérimentale exposée dans cette annexe a été élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (1) avant d'être entérinée et complétée dans le cadre du Système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques (Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adopté par la vingt-huitième Réunion conjointe du Comité sur les produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie, en novembre 1998 (2).

DESCRIPTION DE LA STRATÉGIE D'ÉVALUATION ET D'ESSAI

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (figure), il faut évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais cutanés *in vivo*. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations significatives (par exemple un pH extrême), la totalité des informations existantes doit être prise en considération. L'analyse de la valeur probante des résultats portera sur toutes les données pertinentes concernant les effets de la substance en question, ou de ses analogues; elle débouchera sur une décision qui devra être justifiée. Il conviendra d'accorder une place prépondérante aux données se rapportant aux humains et aux animaux, et d'examiner ensuite les résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* sur la substance. Les essais *in vivo* de substances corrosives devront être évités chaque fois que cela est possible. Les facteurs pris en compte dans la démarche expérimentale sont repris ci-après :

Évaluation des données existantes sur les humains et les animaux (première étape). Les données existantes sur l'être humain, par exemple des études cliniques ou sur les conditions de travail et des rapports sur des cas relevant de ces disciplines, et/ou les résultats d'essais sur animaux, par exemple des essais de toxicité par exposition cutanée unique ou répétée, sont à examiner en premier car ils livrent des informations directement liées aux effets sur la peau. Les substances dont le pouvoir irritant ou corrosif est avéré et celles dont le caractère non corrosif et non irritant a été clairement démontré ne doivent pas faire l'objet d'études *in vivo*.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (deuxième étape). Le cas échéant, les résultats d'essais sur des substances structurellement proches doivent être pris en considération. S'il existe suffisamment de données relatives aux humains et/ou aux animaux sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant, on peut supposer que la substance étudiée provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester la substance. Des résultats négatifs lors d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances ne constituent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'une substance dans le cadre de la démarche expérimentale séquentielle. On déterminera le pouvoir corrosif ou irritant pour la peau en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique (troisième étape). Les substances présentant des valeurs de pH extrêmes, par exemple, $\leq 2,0$ ou $\geq 11,5$, sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice décisif quant au caractère corrosif d'une substance, son pouvoir tampon doit également entrer en ligne de compte (3)(4). Si le pouvoir tampon donne à penser que la substance peut *ne pas être* corrosive pour la peau, cette hypothèse demande à être confirmée par un autre essai, de préférence un essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté (voir étapes 5 et 6).

Toxicité cutanée (quatrième étape). S'il est prouvé qu'une substance chimique est très toxique par voie cutanée, une étude d'irritation ou de corrosion cutanée risque d'être impossible à réaliser *in vivo*, la quantité de substance d'essai normalement appliquée pouvant dépasser la dose très toxique et entraîner ainsi la mort des animaux ou les faire terriblement souffrir. En outre, lorsque des études de toxicité cutanée ont déjà été menées sur des lapins albinos jusqu'à la dose limite de 2 000 mg/kg de poids corporel, ou au-delà, et qu'aucune irritation ou corrosion cutanées n'ont été constatées, il n'est plus forcément nécessaire d'effectuer un essai supplémentaire d'irritation ou de corrosion cutanée. Il convient de faire attention à plusieurs aspects lorsqu'on évalue la toxicité cutanée aiguë à partir d'études antérieures. A titre d'exemple, les informations rapportées sur les lésions cutanées peuvent être incomplètes. Il se peut que les essais et les observations aient été effectués sur une autre espèce que le lapin, or, la sensibilité aux substances est très variable d'une espèce à l'autre. De même, la forme sous laquelle la substance d'essai a été appliquée sur les animaux peut ne pas convenir à l'évaluation de l'irritation et de la corrosion cutanées (par exemple, la dilution des substances (5)). Néanmoins, lorsque des études bien conçues de toxicité cutanée ont été correctement menées sur le lapin, leurs résultats négatifs peuvent être considérés comme une démonstration suffisante du caractère non irritant ni corrosif de la substance.

Résultats des essais in vitro ou ex vivo (étapes 5 et 6). Les substances dont le pouvoir fortement irritant ou corrosif a été mis en évidence par un essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté (6) (7), conçu pour évaluer ces effets particuliers, ne doivent pas être testées sur des animaux. Il est en effet très vraisemblable que ces substances produiront des effets semblables *in vivo*.

Essai in vivo sur des lapins (étapes 7 et 8). Si la décision d'effectuer une étude *in vivo* a été prise sur la base d'une analyse de la valeur des résultats, celle-ci doit débiter par un essai initial réalisé sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que la substance est corrosive pour la peau, il ne faut pas poursuivre les essais. Si l'essai initial ne montre aucun effet corrosif, il y a lieu de confirmer l'absence de réaction ou une réaction d'irritation sur un ou deux animaux supplémentaires exposés à la substance durant quatre heures. Lorsque l'essai initial fait apparaître un effet irritant, l'essai confirmatoire doit être conduit sur un mode séquentiel, ou par l'exposition simultanée des deux animaux supplémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme : Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdail D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) pp 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in : Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors) : *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.
- (6) Méthode d'essai B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483 - 524.

FIGURE

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION CUTANÉES

⁽¹⁾ peut être envisagée avant les étapes 2 et 3.

»

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTELe Ministre de l'Environnement,
B. TOBACK

Annexe 1E

« B. 5. TOXICITE AIGUE : IRRITATION/CORROSION OCULAIRE

1. METHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 405 (2002) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La révision de la présente méthode a porté plus particulièrement sur l'évaluation préalable de toutes les informations existantes se rapportant aux substances d'essai, afin d'éviter les essais inutiles sur les animaux de laboratoire et contribuer ainsi à préserver le bien-être animal. Cette méthode préconise d'analyser la valeur probante des résultats pertinents déjà disponibles (1) avant de procéder à l'essai *in vivo* de corrosion/irritation oculaire décrit ci-après. Il est conseillé de combler le manque de données par des essais séquentiels (2)(3). La démarche expérimentale décrite en annexe à la présente méthode inclut la réalisation d'essais *in vitro* validés et acceptés. Il est en outre recommandé d'effectuer un essai d'irritation/corrosion cutanée *in vivo*, afin de prédire le pouvoir corrosif pour les yeux avant d'envisager un essai oculaire *in vivo*.

Afin de concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* avant d'avoir analysé la valeur probante de toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant de la substance pour les yeux. Ces données comprendront les résultats d'études menées sur des humains et/ou des animaux de laboratoire, des données relatives à l'effet corrosif ou irritant d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (4)(5), et des résultats d'essais *in vitro* et *ex vivo* d'irritation et de corrosion cutanées validés et acceptés (6)(6a). Ces études pourront être effectuées avant ou après l'analyse de la valeur probante des résultats.

Pour certaines substances, une telle analyse peut faire ressortir la nécessité de mener des études *in vivo* afin de déterminer le pouvoir corrosif/irritant de la substance pour les yeux. Dans de tels cas, il est préférable, avant d'envisager un essai oculaire *in vivo*, de commencer par tester *in vivo* les effets cutanés de la substance et de les évaluer conformément à la méthode d'essai B.4 (7). L'analyse de la valeur probante des résultats, couplée à la stratégie d'essai séquentielle, devrait réduire la nécessité de tester *in vivo* l'effet corrosif ou irritant sur les yeux des substances pour lesquelles des études antérieures ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects. Si le pouvoir corrosif ou irritant pour les yeux est impossible à déterminer par la démarche séquentielle, même après réalisation d'un essai *in vivo* d'irritation/corrosion cutanée, on peut tester *in vivo* l'effet corrosif ou irritant sur les yeux.

La démarche expérimentale préconisée, de type séquentiel, comporte des essais de corrosion et d'irritation *in vitro* ou *ex vivo* validés, et est décrite dans l'annexe de la présente méthode. Cette démarche, élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (8) et recommandée à l'unanimité par les participants à cet atelier a été adoptée à titre de recommandation dans le cadre du Système de classification des substances chimiques harmonisé à l'échelon mondial (Globally Harmonized System for the Classification of Chemical Substances - GHS) (9). Bien que cette stratégie séquentielle ne fasse pas partie intégrante de la méthode d'essai B.5, elle constitue cependant la procédure recommandée avant d'entreprendre les essais *in vivo*. S'agissant de nouvelles substances, cette démarche expérimentale par étapes est préconisée pour obtenir des résultats scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant de la substance. En ce qui concerne les substances existantes dont les données sur l'effet corrosif ou irritant sur la peau et les yeux sont insuffisantes, on suppléera à ces dernières en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre démarche expérimentale ou la décision de ne pas procéder par étapes doivent être justifiés.

1.2 DEFINITIONS

L'irritation oculaire désigne des altérations oculaires qui surviennent à la suite de l'application d'une substance d'essai sur la surface antérieure de l'œil, et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant le traitement.

La corrosion oculaire désigne la survenue de lésions tissulaires de l'œil ou une grave détérioration de la vision, qui sont provoqués par l'application d'une substance d'essai sur la surface antérieure de l'œil, et qui ne sont pas totalement réversibles dans les 21 jours suivant le traitement.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La substance d'essai est appliquée en une seule dose sur un des yeux de l'animal d'expérience, l'œil non traité servant de témoin. On évalue le degré de l'irritation ou de la corrosion oculaires en cotant la gravité des lésions affectant la conjonctive, la cornée et l'iris, à intervalles déterminés. Les autres réactions de l'œil et les troubles systémiques sont également décrits de manière à fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleur aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation de la substance. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrant fortement sont définis dans un document cité en référence (10).

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Préparation de l'essai *in vivo*

1.4.1.1 Sélection de l'espèce animale

On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce ou souche sera justifiée, le cas échéant.

1.4.1.2 Préparation des animaux

Les deux yeux de chaque animal susceptible de participer à l'essai doivent être examinés dans les 24 heures précédant le début de l'essai. Les animaux qui présentent des signes d'irritation oculaire, des défauts oculaires ou une lésion de la cornée seront écartés.

1.4.1.3 Conditions d'hébergement et d'alimentation

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (± 3 °C) pour les lapins. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et rester de préférence inférieure à 70 pour cent, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

1.4.2 Mode opératoire

1.4.2.1 Application de la substance d'essai

L'expérimentateur introduit la substance d'essai dans le sac conjonctival d'un des yeux de chaque animal, après avoir délicatement écarté la paupière inférieure du globe oculaire. Il ramène ensuite doucement les deux paupières l'une contre l'autre et les maintient dans cette position pendant environ une seconde afin d'éviter toute perte de substance. L'autre œil, qui ne subit pas de traitement, sert de témoin.

1.4.2.2 Irrigation

Il ne faut pas laver les yeux des animaux traités pendant au moins 24 heures après l'instillation de la substance d'essai, à moins que celle-ci soit à l'état solide (voir paragraphe 1.4.2.3.2) ou déclenche immédiatement des effets corrosifs ou irritants. Au besoin, un lavage pourra être effectué à l'issue de ce délai.

L'utilisation d'un groupe d'animaux satellite pour étudier l'influence du lavage n'est pas indiquée, à moins qu'elle ne se justifie d'un point de vue scientifique. Le cas échéant, on utilisera deux lapins. Les conditions du lavage doivent être décrites minutieusement en indiquant, par exemple, le moment du lavage, la composition et la température de la solution ophtalmique, la durée, le volume et la vitesse d'application.

1.4.2.3 Dose

1.4.2.3.1 Essai de liquides

Pour les liquides, on utilise une dose de 0,1 mL. Il faut éviter d'instiller la substance directement dans l'œil avec un vaporisateur à pression; il est préférable d'en expulser d'abord le contenu, de prélever 0,1 mL de celui-ci dans une fiole et de l'instiller dans l'œil.

1.4.2.3.2 Essai de solides

Dans le cas des solides, pâtes ou substances particulières, la quantité utilisée doit avoir un volume de 0,1 mL ou un poids ne dépassant pas 100 mg. La substance d'essai sera broyée finement. Il convient de mesurer le volume de la substance solide après l'avoir légèrement tassée, par exemple en tapotant le récipient de mesure. Si la substance d'essai solide n'a pas encore été évacuée de l'œil de l'animal par des mécanismes physiologiques au premier moment d'observation, à savoir une heure après le traitement, l'œil peut être rincé à l'aide d'une solution saline ou à l'eau distillée.

1.4.2.3.3 Essai des aérosols

Il est recommandé de prélever une dose du contenu de tous les vaporisateurs à pression et aérosols avant de l'instiller dans l'œil. La seule exception concerne les substances conditionnées en bombes aérosol sous pression, qui sont impossibles à recueillir préalablement à l'instillation car elles se vaporisent. Dans ce cas, l'expérimentateur maintient l'œil de l'animal ouvert et administre la substance à tester en un seul jet d'environ une seconde, émis à 10 cm et directement en face de l'œil. Cette distance peut être modulée en fonction de la pression du jet et de sa composition. Il faut veiller à ce que la pression du jet n'endommage pas l'œil. Dans certains cas, il pourra être nécessaire d'évaluer l'ampleur des dégâts « mécaniques » risquant d'être causés à l'œil par la force du jet.

La dose d'aérosol peut être estimée grâce à une simulation de l'application menée comme suit : la substance est projetée à travers une ouverture de la taille d'un œil de lapin placée directement devant un papier. L'augmentation de poids du papier donne une idée approximative de la quantité administrée dans l'œil du lapin. Pour une substance volatile, la dose peut être estimée à partir du poids du récipient (dans lequel elle est recueillie) avant et après utilisation.

1.4.2.4 Essai initial (essai *in vivo* de l'effet irritant/corrosif sur les yeux mené sur un seul animal)

Conformément à la démarche expérimentale séquentielle (voir annexe 1), il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai *in vivo* sur un seul animal.

Si les résultats de cet essai, mené selon la procédure décrite, indiquent que la substance est corrosive ou fortement irritante pour l'œil, il n'y a pas lieu de mener d'autres essais d'irritation oculaire.

1.4.2.5 Anesthésie locale

L'anesthésie locale se pratique au cas par cas. Si l'analyse de la valeur probante des résultats montre que la substance risque de provoquer une douleur, ou si l'essai initial révèle que l'animal souffrira, un anesthésique local peut être administré avant l'instillation de la substance d'essai. Le type, la concentration et la dose d'anesthésique doivent être choisis avec soin pour éviter que son utilisation n'influe sur la réaction à la substance d'essai. L'œil témoin subira une anesthésie identique.

1.4.2.6 Essai confirmatoire (essai d'irritation oculaire *in vivo* sur des animaux supplémentaires)

Si l'essai initial ne fait apparaître aucun effet corrosif, la réaction négative ou d'irritation demande à être confirmée sur un ou deux animaux supplémentaires. Si l'essai initial provoque une forte irritation, indiquant que l'essai confirmatoire pourrait donner lieu à un effet très marqué (irréversible), on recommande de conduire l'essai confirmatoire sur un mode séquentiel en n'utilisant qu'un seul animal à la fois, plutôt que d'exposer les deux animaux simultanément. Si le deuxième animal manifeste des signes de corrosion ou d'irritation grave, l'essai s'arrête là. On pourra utiliser d'autres animaux s'il y a lieu de confirmer des réactions d'irritation faibles à modérées.

1.4.2.7 Période d'observation

La durée de la période d'observation doit être suffisante pour permettre d'évaluer à fond l'ampleur et la réversibilité des effets observés. Il faut cependant mettre un terme à l'expérience dès qu'un animal manifeste des signes persistants de détresse ou de douleur aiguës (9). Pour déterminer la réversibilité des effets, les animaux doivent normalement être observés durant 21 jours après l'administration de la substance d'essai. Si la réversibilité est constatée avant ce délai, l'expérience prend fin à ce moment-là.

1.4.2.7.1 Observations cliniques et cotation de la gravité des réactions oculaires

On examine les yeux 1, 24, 48 et 72 heures après l'application de la substance d'essai. Les animaux ne seront maintenus à l'épreuve que le temps nécessaire pour obtenir un résultat concluant. Les animaux manifestant des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës doivent être euthanasiés rapidement, et ces symptômes sont à prendre en compte dans l'évaluation de la substance d'essai. Il faudra également euthanasier les animaux qui présentent les lésions oculaires suivantes à la suite de l'instillation : perforation de la cornée ou ulcération profonde de la cornée associée à un staphylocoque; présence de sang dans la chambre antérieure de l'œil; opacité cornéenne de niveau 4 persistant durant 48 heures; absence de réflexe photomoteur (réaction iridienne de niveau 2) durant 72 heures; ulcération de la membrane conjonctivale; nécrose des conjonctives ou de la membrane nictitante, ou décollement du tissu nécrosé. L'euthanasie s'impose parce que ces lésions sont généralement irréversibles.

Les animaux qui ne présentent pas de lésions oculaires peuvent être écartés, mais seulement à partir du quatrième jour suivant l'instillation. Les animaux affectés de lésions légères à modérées doivent être gardés en observation jusqu'à ce que ces lésions disparaissent, ou durant 21 jours, soit jusqu'au terme de l'étude. L'expérimentateur déterminera la nature et la gravité des lésions ainsi que leur réversibilité en observant les animaux aux septième, quatorzième et vingt et unième jours.

L'intensité des réactions oculaires (conjonctives, cornée et iris) doit être consignée à chaque examen (tableau I). Toute autre lésion oculaire (par exemple un pannus, une coloration) et les troubles systémiques doivent également être signalés.

Pour examiner les réactions, on peut s'aider d'une loupe binoculaire, d'une lampe à fente portable, d'un biomicroscope ou d'un autre appareil approprié. Après l'enregistrement des observations effectuées à la vingt-quatrième heure, l'examen des yeux peut se poursuivre à la fluorescéine.

La cotation des réactions oculaires est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions oculaires et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé. La cotation des réactions cutanées devrait faire l'objet d'une évaluation à l'aveugle.

2. RESULTATS

2.2 EVALUATION DES RESULTATS

Le degré d'irritation oculaire devrait être évalué en considération de la gravité des lésions et de leur caractère réversible ou non. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. En revanche, les cotes individuelles ont une valeur de référence et ne sont significatives que lorsqu'elles sont appuyées par une description et une évaluation complètes de toutes les observations.

3. RAPPORT

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Justification de l'essai *in vivo* : analyse de la valeur probante des résultats d'essais préexistants, notamment ceux qui procèdent de la démarche expérimentale séquentielle

- description des données pertinentes livrées par des essais précédents;
- données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale;
- description des essais effectués *in vitro*, détaillant les procédures utilisées et mentionnant les résultats obtenus avec les substances d'essai et avec les substances de référence;
- description de l'étude d'irritation/corrosion cutanée menée *in vivo*, mentionnant les résultats obtenus;
- justification de l'étude *in vivo* après analyse de la valeur probante des résultats disponibles.

Substance d'essai :

- données d'identification (par exemple, numéro CAS, source, pureté, impuretés connues, numéro de lot);
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité, réactivité avec l'eau);
- s'il s'agit d'un mélange : composition et pourcentages relatifs des constituants;
- si on a eu recours à une anesthésie locale : identification, pureté, type, dose et interaction potentielle avec la substance d'essai.

Véhicule :

- identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;
- âge de chaque animal au début de l'essai;
- nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes d'essai et témoin (le cas échéant);
- poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Résultats :

- description de la méthode utilisée pour coter l'irritation à chaque moment d'observation (par exemple lampe à fente portable, biomicroscope, fluorescéine);
- présentation sous forme de tableaux des réactions d'irritation ou de corrosion relevées chez chaque animal et à chaque moment d'observation jusqu'à la fin de la participation de chaque animal à l'essai;
- description circonstanciée du degré et de la nature de l'irritation ou de la corrosion observées;
- description de toute autre lésion oculaire observée (par exemple vascularisation, formation d'un pannus, adhérences, coloration);
- description des effets non oculaires locaux et des troubles systémiques, ainsi que des observations histopathologiques, le cas échéant.

Discussion des résultats.

3.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

L'extrapolation à l'humain des résultats d'études d'irritation oculaire menées sur des animaux de laboratoire n'est valable que dans une certaine mesure. Dans bien des cas, le lapin albinos est plus sensible que l'espèce humaine aux substances irritantes ou corrosives pour l'œil.

Lors de l'interprétation des résultats, il faut savoir reconnaître une irritation consécutive à une infection secondaire, laquelle ne doit pas être prise en compte.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410- 429.
- (2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential : Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159 - 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.12, 227 - 231.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaille, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483 - 524.
- (6a) Méthode d'essai B.40 Corrosion cutanée
- (7) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë : irritation/corrosion cutanée
- (8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme : Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

TABLEAU I : COTATION DES LESIONS OCULAIRES

Cornée

Opacité : degré de densité (les observations porteront sur les zones les plus denses) *

Pas d'ulcération ni d'opacité	0
Zones d'opacité (autres qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses; détails de l'iris nettement visibles	1
Zone translucide aisément discernable; détails de l'iris légèrement masqués	2
Zone nacréée; détails de l'iris complètement invisibles; dimension de la pupille à peine discernable	3
Cornée opaque; iris non discernable à travers l'opacité	4

Maximum possible : 4

* L'étendue de l'opacité cornéenne doit être précisée

Iris

Normal	0
Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie périornéenne modérée ou conjonctives injectées; iris réactif à la lumière (une réaction lente est positive)	1
Hémorragie, destruction marquée, ou absence de réaction à la lumière	2

Maximum possible : 2

Conjonctives

Rougeur (s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, mais pas à la cornée ni à l'iris)	
Normal	0
Hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	1
Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins difficilement discernables les uns des autres	2
Coloration rouge soutenu diffuse	3

Maximum possible : 3

Chémosis

Tuméfaction (s'applique aux paupières et/ou aux membranes nictitantes)

Normal	0
Tuméfaction légèrement supérieure à la normale	1
Tuméfaction patente avec éversion partielle des paupières	2
Tuméfaction avec paupières à demi closes	3
Tuméfaction avec paupières plus qu'à demi closes	4

Maximum possible : 4

Annexe

Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion oculaires

CONSIDERATIONS GENERALES

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation inutile d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai *in vivo*, on évaluera toutes les informations disponibles concernant l'éventuel pouvoir corrosif/irritant d'une substance sur les yeux. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer une substance d'essai quant à son pouvoir d'irritation ou de corrosion oculaire, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à une analyse de la valeur probante des résultats et l'adoption d'une démarche expérimentale séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais *in vivo*, surtout si la substance risque d'engendrer des réactions violentes.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des substances sur les yeux, à l'aide d'une analyse de la valeur probante des résultats, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études *in vivo* sur l'oeil, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales nécessaires. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La démarche expérimentale exposée dans la présente annexe a été élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (1). Elle a par la suite été entérinée et complétée dans le cadre du Système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques (Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adopté par la vingt-huitième Réunion conjointe du Comité sur les produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie, en novembre 1998 (2).

Si cette démarche expérimentale séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.5, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur les yeux. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai *in vivo* et récapitule les facteurs à prendre en considération avant d'envisager un tel essai. La démarche séquentielle préconise une analyse de la valeur probante des données existantes concernant les propriétés d'irritation ou de corrosion oculaires des substances et présente les différentes étapes permettant d'obtenir des données pertinentes sur les substances qui nécessitent d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiées. Elle préconise, dans un premier temps, la réalisation des essais *in vivo* ou *ex vivo* validés et acceptés, et ensuite, dans certaines circonstances, la mise en œuvre des études d'irritation/corrosion cutanée de la méthode d'essai B.4.

DESCRIPTION DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE SEQUENTIELLE

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (figure), il faut évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais oculaires *in vivo*. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations significatives (par exemple un pH extrême), la totalité des informations existantes doit être prise en considération. L'analyse de la valeur probante des résultats portera sur toutes les données pertinentes concernant les effets de la substance en question et de ses analogues; elle débouchera sur une décision qui devra être justifiée. Il conviendra d'accorder une place prépondérante aux données se rapportant aux humains et aux animaux, et d'examiner ensuite les résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* sur la substance. Les essais *in vivo* de substances corrosives devront être évités chaque fois que cela est possible. Les facteurs pris en compte dans la démarche expérimentale sont repris ci-après :

Evaluation des données existantes sur les humains et les animaux (étape 1). Les données existantes sur l'être humain, notamment études cliniques, études sur les conditions de travail et rapports se rapportant à ces études, et/ou les résultats d'essais réalisés sur des animaux dans le cadre d'études oculaires sont à examiner en premier, car ils livrent des informations directement liées aux effets sur les yeux. Il convient ensuite d'évaluer les résultats des études d'irritation/corrosion cutanée menées sur l'homme et/ou l'animal. Les substances ayant un pouvoir avéré d'irritation ou de corrosion oculaires, de même que les substances qui provoquent une irritation ou corrosion cutanées ne doivent pas être instillées dans les yeux des animaux; ces dernières substances sont à considérer comme étant également corrosives et/ou irritantes pour les yeux. Les substances dont le caractère non corrosif et non irritant a été démontré de manière suffisante par des études oculaires antérieures ne doivent pas non plus faire l'objet d'essais *in vivo* sur l'oeil.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (étape 2). Le cas échéant, les résultats d'essais sur des substances structurellement proches doivent être pris en considération. S'il existe suffisamment de données relatives aux humains et/ou aux animaux sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant sur les yeux, on peut supposer que la substance étudiée provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester la substance. Des résultats négatifs lors d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances ne constituent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'une substance dans le cadre de la démarche expérimentale séquentielle. On déterminera le pouvoir corrosif ou irritant pour la peau et pour l'oeil en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique (étape 3) Les substances présentant des valeurs de pH extrêmes, par exemple, $\leq 2,0$ ou $\geq 11,5$ sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice décisif quant au caractère corrosif ou irritant d'une substance pour l'oeil, son pouvoir tampon doit également entrer en ligne de compte (3)(4). Si le pouvoir tampon donne à penser que la substance peut *ne pas être* corrosive pour l'oeil, cette hypothèse demande à être confirmée par un autre essai, de préférence un essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté (voir étapes 5 et 6).

Prise en compte des autres informations existantes (étape 4) Toutes les informations disponibles concernant la toxicité systémique par voie cutanée doivent être évaluées à ce stade. Il convient également d'évaluer la toxicité cutanée aiguë de la substance d'essai. Si la substance d'essai s'est révélée très toxique par voie cutanée, il n'est pas nécessaire de la tester sur les yeux. Même s'il n'y a pas nécessairement de lien entre la toxicité cutanée aiguë et l'irritation/corrosion oculaire, on peut considérer que si un agent est très toxique par voie cutanée, il entraînera également une toxicité élevée en cas d'instillation dans l'oeil. Ces données peuvent aussi être prises en considération entre les étapes 2 et 3.

Résultats des essais in vitro ou ex vivo (étapes 5 et 6) Il est inutile de tester sur des animaux les substances dont le pouvoir fortement irritant ou corrosif a été mis en évidence par un essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté (7) (8) pour l'évaluation spécifique de l'irritation/corrosion oculaire ou cutanée. Il est en effet très vraisemblable que ces substances produiront des effets semblables *in vivo*. S'il n'existe pas d'essais *in vitro/ex vivo* validés et acceptés, il convient de passer directement à l'étape 7 en ignorant les étapes 5 et 6.

Evaluation in vivo du pouvoir irritant ou corrosif de la substance sur la peau (étape 7) S'il n'existe pas suffisamment d'éléments pour déterminer de façon concluante le pouvoir d'irritation/corrosion oculaire d'une substance à partir des résultats des études susmentionnées, ce pouvoir doit être évalué en premier lieu *in vivo*, suivant la méthode d'essai B.4 (4) et son annexe (9). S'il apparaît que la substance provoque une corrosion ou une forte irritation cutanée, il y a lieu de la considérer comme corrosive ou irritante pour l'oeil, à moins que d'autres éléments ne tendent à prouver le contraire. Auquel cas, un essai oculaire *in vivo* ne serait pas nécessaire. Si la substance n'est pas corrosive ni très irritante pour la peau, il y a lieu de pratiquer un essai oculaire *in vivo*.

Essai in vivo sur des lapins (étapes 8 et 9) : l'étude oculaire *in vivo* doit débiter par un essai initial réalisé sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que la substance est très irritante ou corrosive pour l'oeil, il ne faut pas poursuivre les essais. Si cet essai ne fait apparaître aucun effet de corrosion ni d'irritation marquée, un essai confirmatoire est pratiqué sur deux animaux supplémentaires.

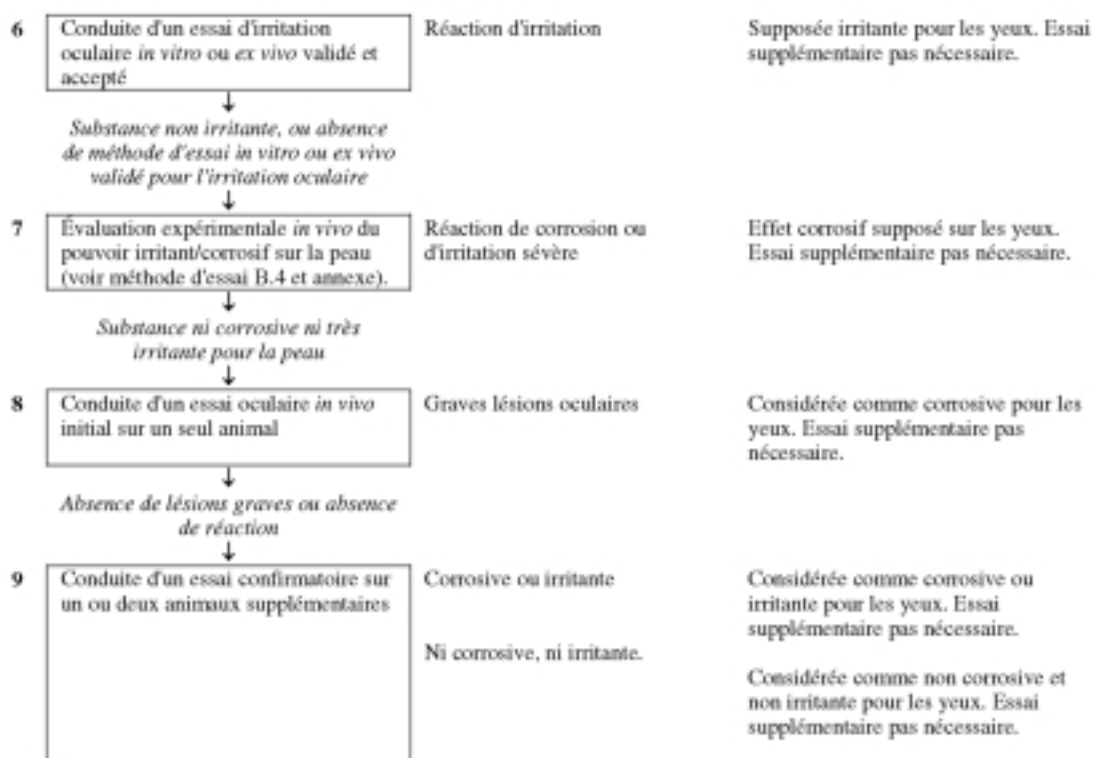
BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme : Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë : irritation/corrosion cutanée
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 - 231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzshutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483 - 524.
- (8) Méthode d'essai B.40 Corrosion cutanée
- (9) Annexe à la méthode d'essai B.4 : Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées

FIGURE

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION OCULAIRES

	Activité	Observation	Conclusion
1	Données existantes sur l'humain et/ou l'animal montrant des effets sur les yeux Données existantes sur l'humain et/ou l'animal montrant des effets de corrosion sur la peau Données existantes sur l'humain et/ou l'animal montrant des effets sévères d'irritation cutanée	Graves lésions oculaires Irritante pour les yeux Ni corrosive, ni irritante pour les yeux Corrosive pour la peau. Très irritante pour la peau	Effet déterminant d'emblée; Considérée comme corrosive pour les yeux Essai pas nécessaire. Effet déterminant d'emblée; Considérée comme irritante pour les yeux Essai pas nécessaire. Effet déterminant d'emblée; Considérée comme non corrosive et non irritante pour les yeux Essai pas nécessaire. Effet corrosif supposé sur les yeux Essai pas nécessaire. Supposée irritante pour les yeux Essai pas nécessaire.
	↓ <i>Pas d'information disponible ou informations non concluantes</i> ↓		
2	Conduite d'une analyse RSA sur la corrosion ou l'irritation oculaire Conduite d'une analyse RSA sur la corrosion cutanée	Effet prévu sur les yeux : lésions graves Effet prévu sur les yeux : irritation Effet prévu sur la peau : corrosion	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai pas nécessaire. Supposée irritante pour les yeux. Essai pas nécessaire. Effet corrosif supposé sur les yeux Essai pas nécessaire.
	↓ <i>Effet impossible à prédire ou prédiction incertaine ou négative</i> ↓		
3	Mesure du pH (pouvoir tampon, le cas échéant) $2 < \text{pH} < 11,5$ ou $\text{pH} \leq 2,0$ ou $\geq 11,5$ avec pouvoir tampon faible ou nul, le cas échéant	$\text{pH} \leq 2$ ou $\geq 11,5$ (avec pouvoir tampon élevé, le cas échéant)	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai pas nécessaire.
	↓		
4	Évaluation de la toxicité systémique par voie cutanée Informations non disponibles, ou substance pas très toxique	Très toxique aux concentrations qui seraient utilisées dans l'essai oculaire	La substance serait trop toxique pour être testée. Essai pas nécessaire.
	↓		
5	Conduite d'un essai <i>in vitro</i> ou <i>ex vivo</i> de corrosion oculaire validé et accepté Substance non corrosive ou absence de méthode d'essai <i>in vitro</i> ou <i>ex vivo</i> validé pour la corrosion oculaire	Réaction de corrosion	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.
	↓		



»

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

Annexe 1F

« B.31. ETUDE DE LA TOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT PRENATAL

1. METHODE

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai n° 414 (2001) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour le développement est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une exposition prénatale sur la femelle gravide et sur l'organisme en développement qu'elle porte en elle; cela recouvre notamment l'évaluation des effets sur la mère, ainsi que la mortalité fœtale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus. Les déficits fonctionnels, qui représentent pourtant un aspect important du développement, ne sont pas étudiés dans le cadre de la présente méthode d'essai. Ces déficits peuvent être étudiés séparément ou en complément à la présente méthode dans le cadre de la méthode d'essai relative à la neurotoxicité pour le développement. Cette dernière méthode ainsi que la méthode relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations indiquent comment dépister les déficits fonctionnels et d'autres effets postnataux.

Il est possible que la présente méthode d'essai nécessite certaines adaptations dans des cas particuliers, compte tenu, par exemple, des propriétés physico-chimiques ou toxicologiques spécifiques de la substance d'essai. Ces adaptations sont acceptables lorsque des données scientifiques convaincantes donnent à penser qu'elles rendront l'essai plus informatif. Le cas échéant, ces données scientifiques devront être soigneusement consignées dans le rapport d'essai.

1.2 DEFINITIONS

Toxicologie du développement : l'étude des effets nocifs sur un organisme en développement, qui peuvent résulter d'une exposition antérieure à la conception, contemporaine au développement prénatal ou postnatal, jusqu'à la maturation sexuelle. La toxicité pour le développement se manifeste principalement par 1) la mort de l'organisme, 2) une anomalie structurelle, 3) une altération de croissance, 4) un déficit fonctionnel. Autrefois, la toxicologie du développement était souvent dénommée "tératologie".

Effet nocif : toute altération liée au traitement par rapport à une situation de référence, qui diminue la capacité d'un organisme à survivre, se reproduire ou s'adapter à l'environnement. La toxicologie du développement, prise dans son sens le plus large, inclut tous les effets qui interfèrent avec le développement normal du produit de conception, avant et après la naissance.

Altération de croissance : une altération qui touche les organes ou le poids corporel ou la taille de la progéniture.

Altérations (anomalies) : altérations structurelles du développement qui comprennent les malformations et les variations (28).

Malformation/Anomalie majeure : changement structurel considéré comme préjudiciable à l'animal (peut aussi être léthal) et généralement rare.

Variation/Anomalie mineure : changement structurel considéré comme peu ou pas préjudiciable à l'animal; peut être transitoire et peut survenir fréquemment dans la population témoin.

Produit de conception : l'ensemble des produits de la fécondation d'un œuf, à n'importe quel stade du développement entre la fécondation et la naissance, comprenant les membranes extra-embryonnaires et l'embryon ou le fœtus.

Implantation (nidation) : la fixation du blastocyste à la muqueuse épithéliale de l'utérus, y compris la pénétration du blastocyste dans l'épithélium utérin et la nidation dans l'endomètre.

Embryon : le premier stade de développement d'un organisme, plus précisément la phase de développement d'un œuf fécondé qui commence après l'apparition du grand axe et s'achève quand toutes les structures principales sont présentes

Embryotoxicité : nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un embryon.

Fœtus : produit de conception, durant la période post-embryonnaire.

Fœtotoxicité : nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un fœtus.

Avortement : expulsion prématurée hors de l'utérus des produits de conception : embryon ou fœtus non viable.

Résorption : phénomène par lequel un produit de conception qui meurt après l'implantation se résorbe ou a été résorbé.

Résorption précoce : trace d'implantation non accompagnée d'un embryon ou d'un fœtus reconnaissable.

Résorption tardive : embryon ou fœtus mort qui présente des changements dégénératifs externes.

DSET : Dose Sans Effet Toxique (correspond à la NOAEL : No Observed Adverse Effect Level)

1.3 SUBSTANCE DE REFERENCE

Aucune

1.4 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Normalement, la substance d'essai est administrée aux femelles gravides, au moins à partir de la nidation et jusqu'à la veille du sacrifice, lequel devrait être programmé à une date aussi proche que possible du jour probable de mise bas, sans être trop tardif pour éviter la perte de données en cas de mise bas prématurée. La méthode d'essai ne porte pas uniquement sur la période de l'organogenèse (comprise, par exemple entre le 5^e et le 15^e jour chez les rongeurs et entre le 6^e et le 18^e jour chez le lapin), mais étudie aussi les effets survenus tout au long de la gestation, depuis le stade pré-implantatoire, selon les besoins, jusqu'à la veille de la césarienne. Les femelles sont sacrifiées peu avant la césarienne, le contenu utérin est examiné et les fœtus étudiés pour détecter les anomalies externes visibles ainsi que les modifications des tissus mous et du squelette.

1.5 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.5.1 Choix de l'espèce animale

Il est recommandé de pratiquer l'essai sur l'espèce la plus appropriée et d'employer les espèces et les souches de laboratoire couramment utilisées dans les essais de toxicité prénatale pour le développement. L'espèce de rongeur préféré est le rat et l'espèce non-rongeur préféré est le lapin. Le cas échéant, l'emploi d'une autre espèce doit être justifié.

1.5.2 Conditions d'encagement et d'alimentation

L'animalerie doit être à 22 °C ($\pm 3^\circ$) pour les rongeurs et à 18 °C ($\pm 3^\circ$) pour les lapins, avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 % sauf durant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra.

L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Bien qu'il soit préférable de placer les animaux s'étant accouplés dans des cages individuelles, l'encagement par petits groupes est aussi acceptable.

1.5.3 Préparation des animaux

Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Les animaux de tous les groupes d'essai devraient, dans toute la mesure du possible, être du même âge et du même poids. On emploiera de jeunes femelles adultes et nullipares pour chaque dose. On accouplera les femelles avec des mâles de la même espèce et de la même souche, sans accoupler les membres d'une même fratrie. Dans le cas des rongeurs, le jour 0 de la gestation est celui où l'on observe un bouchon vaginal et/ou la présence de sperme; s'agissant des lapins, le jour 0 est ordinairement celui du coït ou de l'insémination artificielle si cette technique est utilisée. Les femelles accouplées seront réparties au hasard entre groupes traités et groupes témoins. On installera les cages de façon à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur emplacement. Chaque animal sera désigné par un numéro d'identification propre. En cas d'accouplement par lots, les animaux d'un même lot seront répartis uniformément entre les groupes. De la même façon, les femelles inséminées par un même mâle seront réparties uniformément entre les groupes.

1.6 MODE OPERATOIRE

1.6.1 Nombre et sexe des animaux

Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre de femelles suffisant pour qu'une autopsie puisse être pratiquée sur environ 20 femelles présentant un point d'implantation. Des groupes comptant moins de 16 femelles présentant un point d'implantation risquent d'être inadéquats. La mortalité maternelle n'invalide pas nécessairement l'étude, tant qu'elle demeure inférieure à 10 pour cent environ.

1.6.2 Préparation des doses

Si on emploie un véhicule ou un autre additif pour faciliter l'administration des doses, il convient d'être attentif aux effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la rétention ou l'excrétion de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, lesquels sont susceptibles de modifier sa toxicité ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit pas être toxique pour le développement ni influencer sur la reproduction.

1.6.3 Dosage

Normalement, la substance d'essai est administrée quotidiennement depuis la nidation (par exemple 5 jours après l'accouplement) jusqu'à la veille du jour où la césarienne est prévue. Si des études préliminaires, le cas échéant, ne font pas état d'un risque élevé de pertes pré-implantatoires, il est possible d'administrer le traitement pendant toute la durée de la gestation, depuis l'accouplement jusqu'à la veille de la césarienne. Nul n'ignore que le stress ou des erreurs de manipulation pendant la gestation peuvent engendrer des pertes prénatales. Afin de prévenir des pertes fœtales non liées au traitement, on évitera de manipuler inutilement les femelles gravides ou de les soumettre à des facteurs de stress externes comme le bruit.

On utilise au moins trois doses différentes et un groupe témoin en parallèle. Des animaux sains sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins. Les doses doivent être espacées de façon à produire une gradation des effets toxiques. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée devrait avoir une certaine toxicité pour le développement et/ou la mère (signes cliniques ou diminution du poids corporel), sans entraîner la mort ni provoquer des souffrances importantes. Au moins une dose intermédiaire devrait donner lieu à la plus faible manifestation observable de toxicité. La dose la plus faible ne devrait produire aucun signe de toxicité pour la mère ou pour le développement. Il convient de choisir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une concentration maximale sans effet nocif observé (DSET). L'écart optimal entre les doses d'une série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Bien que le but soit d'établir une DSET maternelle, les études qui n'aboutissent pas à la détermination de cette valeur sont également acceptables (1).

Les doses doivent être choisies en tenant compte de toutes les données de toxicité disponibles ainsi que des informations complémentaires sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. Ces informations seront aussi utiles pour justifier l'échelle des doses.

On incorporera un groupe témoin en parallèle. La substance d'essai n'est pas administrée à ce groupe qui n'est traité que par le véhicule, le cas échéant. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule. Les animaux du ou des groupes témoins seront manipulés de la même façon que les animaux du groupe d'essai. Les groupes témoins auxquels on administre le véhicule doivent recevoir la plus grande quantité utilisée de ce dernier (celle que reçoit le groupe traité à la dose la plus faible).

1.6.4 Essai limite

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, administrée par voie orale, selon la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne aucune toxicité apparente chez les femelles gravides ou dans leur progéniture, et qu'aucun effet n'est escompté au vu des données disponibles (concernant, par exemple, des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues) il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur trois doses différentes. Suivant le niveau d'exposition humaine prévu, il peut être nécessaire d'appliquer une dose orale plus élevée dans l'essai limite. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physicochimiques de la substance d'essai qui définissent et limitent le niveau maximal d'exposition pouvant être atteint (par exemple, l'application cutanée ne doit faire apparaître aucune toxicité locale grave).

1.6.5 Administration des doses

La substance d'essai ou le véhicule sont habituellement administrés oralement par intubation. Si l'expérimentateur opte pour un autre mode d'administration, il devra motiver sa décision et justifier son choix, et procéder aux modifications nécessaires (2) (3) (4). La substance d'essai doit être administrée à peu près à la même heure chaque jour.

Normalement, on calcule la dose destinée à chaque animal d'après la pesée la plus récente de ce dernier. Il convient toutefois d'être prudent lorsqu'on adapte la dose au cours du dernier tiers de la gestation. On s'appuiera sur les données existantes pour sélectionner la dose de façon à prévenir un excès de toxicité pour la mère. Néanmoins, si on constate une toxicité excessive chez les mères traitées, il faudra les euthanasier. Si plusieurs femelles gravides manifestent des signes de toxicité excessive, on envisagera de sacrifier le groupe traité à cette dose. Si on recourt au gavage, il faudrait de préférence administrer la substance en une seule fois à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une seule fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Lorsqu'on utilise de l'huile de maïs comme véhicule, le volume ne devrait pas excéder 0,4 ml/100 g de poids corporel. On réduira au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses.

1.6.6 Observation des mères

Les observations cliniques sont effectuées et notées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en tenant compte de la période durant laquelle on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale. On consignera l'état des animaux, notamment, les animaux morts ou moribonds, les changements comportementaux pertinents et tous les signes de toxicité apparents.

1.6.7 Poids corporel et consommation de nourriture

Les animaux sont pesés au jour 0 de gestation ou au plus tard au jour 3 si des animaux déjà accouplés sont fournis par un éleveur extérieur, puis au premier jour de traitement et au moins tous les trois jours durant la période d'administration et enfin le jour du sacrifice.

Le relevé de la consommation d'aliments doit être effectué tous les trois jours et coïncider avec les jours de pesée des animaux.

1.6.8 Autopsie

On sacrifiera les femelles un jour avant la date prévue de mise bas. Les femelles qui présentent des signes d'avortement ou de mise bas prématurée avant la date prévue du sacrifice doivent être sacrifiées et faire l'objet d'un examen macroscopique complet.

Juste après le sacrifice ou la mort en cours de l'étude, les mères sont soumises à un examen macroscopique destiné à mettre en évidence d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. Pour demeurer objectif, il est préférable que l'expérimentateur ignore la dose administrée au groupe lors de l'observation des mères au cours de la césarienne et de l'examen subséquent des fœtus.

1.6.9 Examen du contenu utérin

Il y a lieu d'enlever l'utérus juste après le sacrifice ou dès que possible après la mort pour s'assurer de l'état de gravidité des femelles. On examinera aussi les utérus apparemment non gravides (par exemple, par coloration au sulfure d'ammonium chez les rongeurs et par la coloration de Salewski ou par une méthode équivalente appropriée chez les lapins) pour confirmer la non-gravidité (5).

Les utérus gravides sont pesés, col inclus. Les poids des utérus gravides de femelles mortes en cours d'essai ne sont pas déterminés.

On compte le nombre de corps jaunes chez les femelles gravides.

Le contenu utérin est examiné afin de relever le nombre d'embryons ou de fœtus morts et le nombre de fœtus viables. Il est nécessaire de décrire le degré de résorption pour évaluer la date approximative de la mort du produit de conception (voir paragraphe 1.2).

1.6.10 Examen des fœtus

Il convient de déterminer le sexe et le poids corporel de chaque fœtus.

On recherche la présence d'altérations externes sur chaque fœtus.

On examine les fœtus pour voir s'ils présentent des altérations du squelette ou des tissus mous (par exemple des variations et des malformations ou des anomalies) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). La catégorisation des altérations fœtales est préférable, mais facultative. Si on procède à une catégorisation, il faut stipuler clairement les critères qui définissent chaque catégorie. On vérifiera avec une attention particulière si le développement du tractus génital n'a pas été altéré.

Pour les rongeurs, on prépare environ la moitié de chaque portée en vue de l'examen des altérations squelettiques. Le restant sera préparé en vue de l'examen des altérations des tissus mous, lequel sera conduit au moyen de coupes sériees réalisées suivant des méthodes reconnues ou appropriées ou de techniques soignées de dissection macroscopique.

S'agissant des non-rongeurs, par exemple les lapins, les éventuelles altérations des tissus mous et du squelette doivent être recherchées sur tous les fœtus. On examine les corps de ces fœtus en les disséquant soigneusement pour repérer des altérations des tissus mous; cette opération peut faire appel à une technique permettant d'effectuer un examen plus approfondi de la structure cardiaque interne (25). Les têtes de la moitié des fœtus examinés de cette manière doivent être prélevées et préparées en vue de l'évaluation des altérations des tissus mous (notamment les yeux, le cerveau, les conduits nasaux et la langue), selon des techniques classiques de coupes sériees (26) ou une méthode ayant la même sensibilité. Les corps de ces fœtus et ceux des fœtus intacts restants sont préparés puis examinés pour établir s'ils présentent des altérations squelettiques, à l'aide des mêmes méthodes que pour les rongeurs.

2 RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats sont consignés séparément pour chaque femelle et sa progéniture, et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de chaque mort ou euthanasie, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'observations pratiquées sur les embryons ou fœtus et toutes les données pertinentes sur la portée.

On évaluera les résultats numériques par une méthode statistique appropriée, en prenant la portée comme unité pour l'analyse des résultats. Il convient d'utiliser une méthode statistique reconnue; le choix de la méthode doit intervenir au stade de la conception de l'étude et doit être justifié. Les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date programmée du sacrifice doivent aussi être consignés. Ces résultats peuvent être inclus dans les moyennes des groupes, s'il y a lieu. La pertinence des résultats obtenus pour ces animaux et partant, la décision de les inclure ou non dans une moyenne de groupe, doit être appréciée au cas par cas.

2.2 EVALUATION DES RESULTATS

Les résultats de l'étude de toxicité pour le développement prénatal doivent être évalués du point de vue des effets observés. L'évaluation doit comprendre les informations suivantes :

- les résultats des essais maternels et fœtaux, incluant une évaluation de la relation, ou de l'absence de relation, entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et la fréquence et la gravité de tous les effets observés;
- les critères appliqués pour catégoriser, le cas échéant, les altérations externes des fœtus, et les altérations de leurs tissus mous ou de leur squelette;
- selon les besoins, les données antérieures relatives aux témoins pour affiner l'interprétation des résultats de l'étude;
- les nombres utilisés pour calculer tous les pourcentages ou indices;
- l'analyse statistique appropriée des résultats de l'étude; il convient de fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Pour toute étude ne révélant aucun effet toxique, il y a lieu d'envisager des expériences complémentaires destinées à déterminer l'absorption et la biodisponibilité de la substance d'essai.

2.3 INTERPRETATION DES RESULTATS

Une étude de la toxicité pour le développement prénatal fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance administrée durant la gestation sur les mères et sur le développement intra-utérin de leur progéniture. Les résultats de cette étude doivent être interprétés à la lumière de ceux des études de toxicité subchronique, de reproduction, des études toxicocinétiques et autres. Comme l'étude est centrée à la fois sur la toxicité générale du point de vue de la mère et sur la toxicité pour le développement, ses résultats permettront dans une certaine mesure de distinguer les effets sur le développement qui surviennent en l'absence d'une toxicité générale, des effets qui n'apparaissent qu'à des doses qui sont également toxiques pour la mère (27).

3 RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations particulières énumérées ci-dessous :

Substance d'essai :

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques
- identification, y compris le numéro du CAS s'il est connu
- pureté

Véhicule (le cas échéant) :

- justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau.

Animaux d'expérience :

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

Conditions d'essai :

- justification du choix des doses appliquées;
- détails concernant la préparation de la substance d'essai ou son incorporation aux aliments, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- détails sur l'administration de la substance d'essai;
- conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu;
- conditions ambiantes
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats :

Données relatives à la toxicité pour la mère en fonction des doses, précisant entre autres :

- le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de survivants, le nombre de femelles gravides, le nombre d'avortements et de mises bas prématurées;
- le jour de la mort si celle-ci est intervenue en cours d'essai et le nombre des animaux ayant survécu jusqu'au jour du sacrifice;
- les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date du sacrifice doivent être consignés, mais non inclus dans les comparaisons statistiques entre les groupes;
- le jour de l'observation de chaque signe clinique anormal et son évolution ultérieure;
- le poids corporel, sa variation et le poids de l'utérus gravide, y compris, si on le souhaite, la variation du poids corporel corrigée en fonction du poids de l'utérus gravide;
- la consommation de nourriture, et d'eau si elle a été mesurée;
- les résultats de l'autopsie, y compris le poids de l'utérus;
- les valeurs de la DSET se rapportant aux effets sur la mère et sur le développement.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées attestées par des implantations, notamment :

- nombre de corps jaunes;
- nombre d'implantations, nombre et pourcentage de fœtus vivants et morts et nombre de résorptions;
- nombre et pourcentage de pertes pré- et postimplantatoires.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées comportant des fœtus vivants, notamment :

- nombre et pourcentage de descendants vivants;
- proportion de mâles et de femelles;
- poids corporel des fœtus, de préférence par sexe et pour les deux sexes confondus;
- malformations externes, des tissus mous et du squelette et autres altérations pertinentes;
- critères de catégorisation, le cas échéant;
- nombre total et pourcentage de fœtus et de portées présentant une quelconque altération externe, des tissus mous ou du squelette; types et fréquence des différentes anomalies et autres altérations pertinentes.

Discussion

Conclusions.

4 BIBLIOGRAPHIE

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
- (2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350 : Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247 :367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47 :229-242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development : The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127 :291-306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats : Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.
- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to *Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology : Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In : *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

Annexe 1G**« B.35. ETUDE DE TOXICITE POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GENERATIONS****1. METHODE**

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai n° 416 (2001) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une substance d'essai sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gestation, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance d'essai sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement et orienter des essais ultérieurs. Cette méthode étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que la croissance et le développement de la génération F2. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels en complétant le présent protocole par des études décrites dans les méthodes d'essai relatives à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou en procédant à des études séparées à l'aide de méthodes d'essai appropriées.

1.2 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La substance d'essai est administrée à différentes doses échelonnées suivant une gradation à plusieurs groupes de mâles et de femelles. On administre la substance aux mâles de la génération P (génération parentale) durant leur croissance et pendant au moins un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de mettre en évidence tous ses effets nocifs sur la spermatogenèse. Les effets sur le sperme sont déterminés d'après plusieurs paramètres, comme la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, sur des préparations de tissus et au cours d'un examen histopathologique détaillé. Si l'on dispose de données sur la spermatogenèse provenant d'une précédente étude à doses répétées de durée suffisante, par exemple 90 jours, il n'est pas nécessaire d'inclure les mâles de la génération P dans l'évaluation. Il est toutefois recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements numériques du sperme de la génération P, en vue d'une évaluation ultérieure. Les femelles de la génération P doivent être traitées durant la croissance et pendant plusieurs cycles œstraux complets de manière à pouvoir détecter tous les effets nocifs de la substance d'essai sur le cycle œstral. La substance d'essai est administrée aux animaux de la génération P durant la période d'accouplement, pendant les gestations qui en résultent et jusqu'au sevrage de la descendance F1. Après le sevrage, la descendance F1 continue de recevoir la substance durant toute sa croissance et l'administration se poursuit au cours de l'accouplement et de la production de la génération F2, jusqu'au sevrage de cette dernière.

Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité; cet examen s'attache en particulier à l'évaluation des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance.

1.3 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI**1.3.1 Choix des espèces**

Le rat est l'espèce qui convient le mieux à cet essai. Si on utilise une autre espèce, il faut justifier ce choix et effectuer les adaptations qui s'imposent. Les souches à faible taux de fécondité ou chez lesquelles l'incidence des anomalies du développement est notablement élevée sont à proscrire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés doit être minimale et ne doit pas dépasser 20 % du poids moyen des représentants de chaque sexe.

1.3.2 Conditions d'encagement et d'alimentation

L'animalerie doit être à 22 °C (+3 °C), avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 %, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'y incorporer la substance d'essai, si elle est administrée par cette voie.

Les animaux peuvent être encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe. L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Après constatation de la copulation, les femelles s'étant accouplées seront placées dans des cages individuelles aménagées pour la mise-bas ou la maternité. Les rates s'étant accouplées peuvent aussi être encagées par petits groupes et séparées un ou deux jours avant la mise-bas. À l'approche de la mise-bas, on leur fournira des matériaux de nidification appropriés et déterminés.

1.3.3 Préparation des animaux

Il convient d'utiliser de jeunes animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Il importe de connaître les liens collatéraux entre les animaux, afin de ne pas accoupler les membres d'une même fratrie. Les animaux sont répartis au hasard entre les groupes témoins et les groupes traités (il est recommandé de les regrouper par tranche de poids corporel). Les cages sont placées de manière à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur disposition. Chaque animal est désigné par un numéro d'identification propre. Les animaux de la génération P doivent être identifiés avant le début du traitement; ceux de la génération F1 qui sont sélectionnés pour l'accouplement seront identifiés au moment du sevrage. On notera la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1 sélectionnés. Il est également recommandé d'identifier chaque petit dès que possible après la naissance, si on envisage de les peser individuellement ou d'effectuer des essais fonctionnels.

Les animaux de la génération P seront âgés de 5 à 9 semaines au début du traitement. Tous les groupes d'essai doivent être aussi homogènes que possible quant au poids et à l'âge des animaux.

1.4 MODE OPERATOIRE**1.4.1 Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe d'essai ou témoin doit comporter un nombre d'animaux suffisant pour que l'on puisse disposer en fin d'essai d'au moins 20 femelles gravides à terme ou presque. Pour les substances qui occasionnent des effets indésirables (stérilité, toxicité excessive à la dose élevée, par exemple), cela risque d'être impossible. Le but est d'obtenir suffisamment de femelles gravides pour pouvoir procéder à une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel et la période d'allaitement, la croissance et le

développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité, et sur le développement de leur descendance F2 jusqu'au sevrage. En conséquence, le fait de ne pas avoir obtenu le nombre souhaité de femelles gravides (c'est-à-dire 20) n'invalide pas nécessairement l'étude, et la situation doit être évaluée au cas par cas.

1.4.2 Préparation des doses

Il est recommandé d'administrer la substance d'essai par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) à moins qu'une autre voie (cutanée ou par inhalation) ne soit jugée plus adéquate.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis d'une solution ou d'une émulsion dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu d'une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule n'est pas aqueux, sa toxicité doit être connue. Il faut déterminer la stabilité de la substance d'essai dans le véhicule.

1.4.3 Dosage

On utilise au moins trois doses différentes et un témoin en parallèle. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit faire apparaître une certaine toxicité, sans entraîner la mort ni provoquer de souffrances aiguës. En cas de mortalité inattendue, si le taux de mortalité de la génération parentale est inférieur à environ 10 pour cent, l'étude reste en général acceptable. Il convient de choisir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet ainsi qu'une dose sans effets toxiques (DSET). L'écart optimal entre chaque dose de la série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre, et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, l'écart entre les doses ne doit pas être supérieur à un facteur trois. Le choix des doses sera orienté par toutes les données existantes sur la toxicité, en particulier les résultats des études à doses répétées. Toute information sur le métabolisme et la cinétique de la substance d'essai ou d'un composé apparenté doit également être prise en considération. Ces informations serviront aussi à justifier l'échelle des doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin seront traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Lorsque la substance d'essai est administrée mélangée aux aliments et qu'il en résulte une diminution de la prise ou la consommation de nourriture, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter un groupe témoin nourri en parallèle. Les résultats d'études contrôlées destinées à évaluer les effets d'une diminution de la consommation de nourriture sur les paramètres de la reproduction peuvent remplacer l'utilisation d'un groupe témoin nourri en parallèle.

Il convient d'être attentif, le cas échéant, aux effets du véhicule ou des autres additifs sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, susceptibles de modifier sa toxicité, ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.4 Essai limite

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour administrée par voie orale ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson selon un pourcentage équivalent, conformément à la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne pas de signes de toxicité observables chez les parents ou dans leur progéniture et qu'aucun effet toxique n'est escompté au vu des données disponibles concernant des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. L'essai limite n'a pas de raison d'être lorsque le niveau d'exposition humaine implique l'utilisation d'une dose orale plus élevée. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, comme sa solubilité, limitent souvent la concentration maximale applicable.

1.4.5 Administration des doses

Les animaux reçoivent la substance d'essai quotidiennement, sept jours sur sept. L'administration par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) est préférable. Si l'on opte pour un autre mode d'administration, il convient de justifier ce choix et d'apporter les modifications nécessaires, le cas échéant. On appliquera le même mode d'administration à tous les animaux, durant la période expérimentale adéquate. Si la substance d'essai est administrée par gavage, on procédera à l'aide d'une sonde gastrique. Le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100 g de poids pour l'huile de maïs), sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf dans le cas de substances irritantes ou corrosives dont les effets s'intensifient généralement aux concentrations supérieures, il y a lieu de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses. Dans les études par gavage, les petits ne reçoivent normalement la substance d'essai qu'indirectement, par le lait maternel, jusqu'à ce que l'administration directe débute pour eux, à partir du sevrage. Lorsque la substance d'essai est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits reçoivent aussi la substance d'essai directement dès qu'ils commencent à s'alimenter seuls, lors de la dernière semaine d'allaitement.

Il est important de s'assurer que les quantités de substances administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Si la substance d'essai est ajoutée à la nourriture, elle peut être administrée à concentration constante dans cette dernière (ppm) ou à dose constante par rapport au poids de l'animal; il y a lieu de préciser l'option retenue. Si l'on recourt au gavage, il faut toujours administrer la substance d'essai à peu près à la même heure chaque jour et ajuster la dose au moins une fois par semaine pour qu'elle demeure constante par rapport au poids de l'animal. Cet ajustement devra tenir compte de la diffusion placentaire.

1.4.6 Programmes expérimentaux

L'administration quotidienne de la substance d'essai aux mâles et aux femelles de la génération P doit débiter quand ils sont âgés de 5 à 9 semaines. Pour les mâles et les femelles de la génération F1, elle débutera au sevrage; il faut tenir compte du fait que, lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il est possible que les petits de la génération F1 soient déjà exposés directement à la substance durant la période d'allaitement. Les deux sexes des générations P et F1 continueront à recevoir la substance pendant au moins 10 semaines avant la période d'accouplement. Le traitement sera poursuivi pour les deux sexes durant les deux semaines de la période d'accouplement. Les mâles qui ne serviront pas à l'évaluation des effets sur la reproduction seront euthanasiés et examinés. Les femelles de la génération P continueront à recevoir la substance d'essai tout au long de la gestation et jusqu'au sevrage de leur descendance F1. Il sera peut-être nécessaire de modifier le programme d'administration des doses à la lumière des informations disponibles sur la substance d'essai, notamment en ce qui

concerne la toxicité, l'induction métabolique ou la bioaccumulation. La dose administrée à chaque animal est normalement calculée d'après les résultats de la dernière pesée de l'animal. Toutefois, la prudence s'impose lors de l'ajustement de la dose au cours du dernier tiers de la gestation.

Le traitement des mâles et des femelles P et F1 se poursuit jusqu'à leur sacrifice. Tous les adultes mâles et femelles P et F1 qui ne sont plus nécessaires pour l'évaluation des effets sur la reproduction doivent être euthanasiés. Les descendants F1 qui n'ont pas été sélectionnés pour l'accouplement et tous les descendants F2 seront euthanasiés après le sevrage.

1.4.7 Accouplement

1.4.7.1 Accouplement de la génération parentale (P)

Pour chaque accouplement, on réunira une femelle et un mâle traités à la même dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce qu'ils aient copulé ou durant deux semaines. Les femelles subiront un examen quotidien destiné à détecter la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme étant celui où l'on observe du sperme ou un bouchon vaginal. Si l'accouplement n'a pas lieu, on peut envisager de faire une deuxième tentative en réunissant les femelles avec des mâles du même groupe ayant fait leurs preuves. Les couples doivent être clairement identifiés dans les résultats. On évitera d'accoupler des membres d'une même fratrie.

1.4.7.2 Accouplement de la génération F1

S'agissant de l'accouplement de la génération F1, on sélectionne au moins un mâle et une femelle de chaque portée, au moment du sevrage, en vue de les accoupler avec d'autres descendants traités à la même dose, mais issus d'une autre portée, afin d'obtenir la génération F2. La sélection des petits au sein d'une même portée doit se faire au hasard s'ils ne diffèrent pas de façon significative quant au poids corporel ou à l'apparence. Si l'on constate de telles différences, on sélectionnera les meilleurs représentants de chaque portée. D'un point de vue pragmatique, il est plus facile d'opérer cette sélection en fonction du poids corporel, mais il pourrait être plus pertinent de se fonder sur l'apparence. Les descendants F1 ne doivent pas être accouplés avant d'avoir atteint leur pleine maturité sexuelle.

On évaluera les couples sans descendance afin de déterminer la cause apparente de leur stérilité. A cet effet, on pourra donner aux animaux d'autres occasions de s'accoupler avec d'autres mâles ou femelles ayant fait leurs preuves, effectuer un examen microscopique des organes reproducteurs, ou analyser les cycles œstraux ou la spermatogenèse.

1.4.7.3 Deuxième accouplement

Dans certains cas, notamment lorsque la taille de la portée est modifiée par le traitement ou lorsqu'un effet équivoque est observé dans le premier accouplement, on préconise d'accoupler une deuxième fois les adultes P ou F1, afin d'obtenir une deuxième portée. Il est recommandé d'accoupler une deuxième fois les mâles ou les femelles qui n'ont pas engendré de portée avec un reproducteur ou une reproductrice ayant fait ses preuves. Si la production d'une deuxième portée est jugée nécessaire, le deuxième accouplement doit avoir lieu environ une semaine après le sevrage de la dernière portée.

1.4.7.4 Taille de la portée

On laisse les animaux mettre bas normalement et élever leur progéniture jusqu'au sevrage. La normalisation de la taille des portées est facultative; si l'on y recourt, il faut décrire en détail la méthode utilisée.

1.5 OBSERVATIONS

1.5.1 Observations cliniques

Une observation clinique générale est réalisée chaque jour; en cas d'administration par gavage, l'heure à laquelle cette observation est réalisée doit tenir compte du moment où l'on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale après administration. On notera les changements de comportement, les signes de mise-bas prolongée ou difficile et tous les symptômes de toxicité. En outre, au moins une fois par semaine, chaque animal devra faire l'objet d'un examen plus détaillé qui pourrait être aisément réalisé à l'occasion d'une pesée de l'animal. Deux fois par jour et une fois par jour pendant le week-end, selon les besoins, on recherchera des signes de morbidité et de mortalité sur tous les animaux.

1.5.2 Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau des animaux parents

Les animaux parents (P et F1) sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. Les mères (P et F1) sont pesées au minimum aux jours 0, 7, 14, et 20 ou 21 de la gestation, puis aux mêmes jours que leurs petits durant l'allaitement, et enfin le jour de leur sacrifice. Les résultats sont consignés individuellement pour chaque animal adulte. Durant la période qui précède l'accouplement et pendant la gestation, la consommation de nourriture est mesurée au moins une fois par semaine. La consommation d'eau est relevée au moins une fois par semaine si la substance d'essai est administrée dans l'eau.

1.5.3 Cycle œstral

La durée et la normalité du cycle œstral sont évaluées chez les femelles P et F1 à l'aide de frottis vaginaux, avant l'accouplement, et facultativement pendant la période d'accouplement, jusqu'à constatation de preuves d'accouplement. Les cellules vaginales ou cervicales seront prélevées avec soin pour éviter d'agresser la muqueuse et d'induire ainsi une pseudogestation (1).

1.5.4 Paramètres d'évaluation du sperme

On note le poids des testicules et des épидидymes de tous les mâles P ou F1 sacrifiés, en conservant un exemplaire de chaque organe pour l'examen histopathologique (voir paragraphes 1.5.7, 1.5.8.1). On réservera les testicules et les épидидymes d'un sous-lot composé d'au moins dix mâles de chaque génération (P et F1) pour la numération des spermatozoïdes résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme. Dans ce même sous-lot de mâles, on recueillera le contenu de la queue de l'épididyme ou du canal déférent en vue d'évaluer la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. Si des effets liés au traitement sont observés ou si d'autres études révèlent que la substance peut avoir des effets sur la spermatogenèse, l'évaluation du sperme sera réalisée sur tous les mâles traités aux différentes doses; dans le cas contraire, on pourra limiter la numération aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée.

Il convient de dénombrer la totalité des spermatozoïdes testiculaires résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (2) (3). Le nombre de spermatozoïdes mis en réserve dans la queue de l'épididyme peut être déduit de la concentration et du volume des spermatozoïdes dans la suspension utilisée pour compléter les évaluations qualitatives, et du nombre de spermatozoïdes récupérés après le broyage et/ou l'homogénéisation ultérieurs du tissu caudal restant. La numération doit être effectuée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice, à moins qu'on ne réalise des enregistrements vidéo ou numériques ou qu'on ne congèle des échantillons en vue d'une analyse ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on

n'observe pas d'effets liés au traitement (révélés par exemple par la numération, la morphologie ou la motilité des spermatozoïdes), il n'est pas nécessaire d'analyser les groupes traités aux autres doses. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la dose la plus élevée, on évaluera aussi les groupes traités aux doses plus faibles.

La motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme ou le canal déférent est évaluée ou enregistrée sur support vidéo immédiatement après le sacrifice. Le sperme, prélevé de façon à éviter autant que possible de léser les organes, est dilué en vue de l'analyse de la motilité selon une méthode acceptable (4). Il convient d'évaluer subjectivement ou objectivement le pourcentage de spermatozoïdes devenant progressivement mobiles. Si l'on pratique une analyse du mouvement assistée par ordinateur (5) (6) (7) (8) (9) (10), la motilité progressive est évaluée d'après les seuils définis par l'utilisateur pour la vitesse moyenne de trajectoire, la rectilignité ou l'index linéaire. Si les échantillons sont enregistrés en vidéo (11) ou si les images sont enregistrées d'une autre manière au moment de l'autopsie, l'analyse subséquente pourra se limiter aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, à moins que des effets liés au traitement n'aient été observés, auquel cas il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles. En l'absence d'une image vidéo ou numérique, tous les échantillons de tous les groupes traités devront être analysés lors de l'autopsie.

On procédera à une évaluation morphologique d'un échantillon de sperme de l'épididyme ou du canal déférent. Les spermatozoïdes (au moins 200 par échantillon) doivent être examinés dans des préparations fixées et en milieu liquide (12), puis classés en tant que spécimens normaux ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées. L'évaluation doit être réalisée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice ou ultérieurement à partir des enregistrements vidéo ou numériques. Les frottis, une fois fixés, peuvent aussi être analysés à une date ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (sur la morphologie des spermatozoïdes, par exemple), l'analyse des groupes traités aux autres doses devient superflue. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la plus dose élevée, il convient d'évaluer également les groupes traités aux doses plus faibles.

Si l'un des paramètres d'évaluation du sperme mentionnés plus haut a déjà été examiné dans le cadre d'une étude de toxicité systémique d'au moins 90 jours, il ne doit pas nécessairement être réévalué au cours de l'étude de la toxicité sur deux générations. Il est cependant recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements vidéo du sperme de la génération P, pour permettre une évaluation ultérieure si nécessaire.

1.5.5 Descendance

On examine chaque portée dès que possible après la mise-bas (jour 0 de l'allaitement), afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques. Les petits trouvés morts au jour 0 seront de préférence examinés, s'ils ne sont pas macérés, afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies et de déterminer la cause de la mort, et conservés. Les petits vivants doivent être comptés et pesés individuellement à la naissance (jour 0 de l'allaitement) ou le jour 1, et pesés régulièrement par la suite, par exemple les jours 4, 7, 14 et 21 de l'allaitement. On notera les anomalies physiques et comportementales observées chez les mères ou les petits.

Le développement physique de la descendance est consigné essentiellement sous la forme du gain de poids corporel. D'autres paramètres physiques (ouverture des oreilles et des yeux, sortie des dents, développement de la pilosité, par exemple) peuvent fournir des informations supplémentaires, mais ces observations sont de préférence réservées à l'évaluation de la maturité sexuelle (âge et poids corporel au moment de l'ouverture vaginale ou de la séparation balano-préputiale, par exemple) (13). Il est recommandé de réaliser des explorations fonctionnelles (l'activité motrice, les fonctions sensorielles, l'ontogenèse des réflexes, par exemple) de la descendance F1 avant et/ou après le sevrage, notamment celles qui se rapportent à la maturation sexuelle, si elles ne sont pas explorées dans d'autres études. On détermine l'âge auquel sont survenus l'ouverture vaginale ou la séparation balano-préputiale chez les descendants F1 tout juste sevrés qui ont été sélectionnés en vue de l'accouplement. Il convient de mesurer la distance ano-génitale chez les petits F2, le jour de leur naissance, si l'on a constaté une modification de la proportion de mâles et de femelles ou de l'âge de maturation sexuelle dans la génération F1.

Les observations fonctionnelles ne s'imposent plus pour les groupes présentant des signes évidents de toxicité (diminution sensible de la prise de poids, etc., par exemple). Les explorations fonctionnelles, le cas échéant, seront réalisées sur les petits non sélectionnés pour l'accouplement.

1.5.6 Examen macroscopique

Juste après le sacrifice ou la mort si celle-ci survient en cours d'étude, tous les animaux parents (P et F1), tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques, ainsi qu'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) sont soumis à un examen macroscopique destiné à révéler d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. L'examen des organes reproducteurs doit faire l'objet d'une attention particulière. Il y a lieu d'examiner les petits moribonds qui ont été euthanasiés ainsi que les petits morts, s'ils ne sont pas macérés, afin de détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de la mort, et de les conserver.

On examinera les utérus de toutes les femelles primipares, sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

1.5.7 Pesée des organes

Juste après le sacrifice, on détermine le poids corporel de tous les parents P et F1 ainsi que le poids des organes suivants (les deux exemplaires des organes qui vont par paires doivent être pesés séparément) :

- Utérus, ovaires;
- Testicules, épидидymes (entiers et queues);
- Prostate;
- Vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides, et prostate (ensemble);
- Cerveau, foie, reins, rate, hypophyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus.

Les poids corporels des petits F1 et F2 retenus pour l'autopsie sont déterminés après le sacrifice, de même que le poids du cerveau, de la rate et du thymus d'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard (voir paragraphe 1.5.6).

Si possible, les résultats de l'autopsie et de la pesée des organes doivent être interprétés à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées.

1.5.8 Histopathologie

1.5.8.1 Animaux parents

Les organes et tissus ci-après des animaux parents (P et F1), ou des échantillons représentatifs de ces derniers, sont fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique.

- Vagin, utérus avec col, et ovaires (conservés dans un fixateur approprié);
- Un testicule (conservé dans un fixateur approprié), un épидидyme, les vésicules séminales, la prostate et une glande coagulante;
- Organe(s) cible(s) précédemment identifié(s) de tous les animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement.

Tous les animaux P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, qui ont été sélectionnés pour l'accouplement, doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet des organes et tissus susmentionnés. L'examen des ovaires des femelles P est facultatif. Il convient également d'examiner les organes présentant des altérations liées au traitement dans les groupes traités à la dose la plus faible et à la dose intermédiaire, afin de faciliter la détermination de la DSET. De plus, une évaluation histopathologique sera pratiquée sur les organes reproducteurs des animaux traités aux doses faibles et moyennes, chez lesquels on soupçonne une diminution de la fertilité, par exemple, ceux qui ne se sont pas accouplés, qui n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains, ou ceux chez qui on a constaté des modifications du cycle œstral ou du nombre, de la motilité ou de la morphologie des spermatozoïdes. Toutes les lésions macroscopiques telles qu'atrophies ou tumeurs doivent être examinées.

Un examen histopathologique détaillé des testicules doit être effectué (par exemple, fixation dans du liquide de Bouin, inclusion dans la paraffine et coupes transversales de 4-5 µm d'épaisseur) afin de mettre en évidence des effets liés au traitement, notamment une rétention de spermatides, l'absence de certaines couches ou types de cellules germinales, la présence de cellules géantes multinucléées ou le décollement des cellules spermatogènes dans la lumière des tubules séminifères (14). L'examen d'un épидидyme intact doit porter sur la tête, le corps et la queue, ce qui peut être effectué sur une section longitudinale. On observera l'épididyme pour voir s'il ne s'y produit pas d'infiltration de leucocytes, de changement dans la fréquence des types cellulaires et de phagocytose des spermatozoïdes, et s'il ne renferme pas de cellules aberrantes. L'examen des organes reproducteurs mâles peut être effectué à l'aide d'une coloration à l'acide périodique-Schiff ou à l'hématoxyline.

Après la lactation, l'ovaire devrait contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance ainsi que les grands corps jaunes de la lactation. L'examen histopathologique doit révéler une déplétion qualitative de la population de follicules primordiaux. Les follicules primordiaux des femelles F1 feront l'objet d'une évaluation quantitative; le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de sections doivent être statistiquement valables pour la méthode d'évaluation employée. L'examen comprend la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, aux fins de la comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins (15) (16) (17) (18) (19).

1.5.8.2 Petits sevrés

Les tissus présentant des anomalies macroscopiques et les organes cibles de tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques ainsi que ceux du petit/du sexe/de la portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) et non retenu(e) pour l'accouplement seront fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique. La description histopathologique complète des tissus conservés sera plus particulièrement axée sur les organes reproducteurs.

2 RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats obtenus sur chaque animal seront consignés et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'altérations histopathologiques et toutes les données pertinentes sur la portée.

Les résultats numériques seront évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et reconnue; le choix des méthodes statistiques doit intervenir lors de la conception de l'étude et doit être justifié. Les modèles statistiques s'appliquant aux relations "dose-effet" peuvent être utiles à l'analyse des résultats. Le rapport doit fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

2.2 EVALUATION DES RESULTATS

Les résultats de cette étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations doivent être évalués en fonction des effets observés, notamment à l'autopsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation portera sur la relation, ou l'absence de relation, entre la dose administrée de substance d'essai et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment lésions macroscopiques, organes cibles identifiés, altération de la fertilité, anomalies cliniques, altération de la capacité de reproduction et des performances de la portée, modifications du poids corporel, effets sur la mortalité et tout autre effet toxique. Les propriétés physicochimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques doivent être prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

Une étude de toxicité pour la reproduction correctement menée doit fournir une estimation satisfaisante de la dose sans effet et permettre de comprendre les effets nocifs de la substance étudiée sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et le développement postnatal, notamment la croissance et la maturation sexuelle.

2.3 INTERPRETATION DES RESULTATS

Une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée à une substance durant toutes les phases du cycle de reproduction. L'étude livre notamment des informations sur les paramètres de la reproduction ainsi que sur le développement, la croissance et la survie des descendants. Les résultats de l'étude doivent être interprétés à la lumière des résultats des études subchroniques, prénatales, de développement, toxicocinétiques et autres disponibles. Les résultats de la présente étude peuvent servir à apprécier la nécessité de réaliser d'autres essais sur une substance chimique. L'extrapolation des résultats de l'étude à l'homme présente un intérêt limité. Ces résultats se prêtent davantage à la détermination des concentrations sans effet et des niveaux d'exposition humaine acceptables (20) (21) (22) (23).

3 RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques
- identification
- degré de pureté

Véhicule, le cas échéant :

- justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau

Animaux d'expérience :

- espèce et souche
- nombre, âge et sexe des animaux
- origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc.
- poids de chaque animal au début de l'essai

Conditions d'essai :

- justification du choix des doses
- détails concernant la formulation de la substance d'essai/son incorporation aux aliments, la concentration obtenue
- stabilité et homogénéité de la préparation;
- détails concernant l'administration de la substance d'essai;
- conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu;
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats :

- consommation de nourriture, et d'eau si elle a été enregistrée, efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme d'aliments consommés), et consommation de la substance d'essai par les animaux P et F1, sauf pendant la cohabitation et durant au moins le dernier tiers de la période d'allaitement;
- données sur l'absorption, le cas échéant;
- poids corporel des animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement;
- données relatives aux portées et au poids des petits;
- poids corporel au moment du sacrifice et poids absolu et relatif des organes des animaux parents;
- nature, gravité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non);
- date de mort en cours d'étude ou animaux ayant survécu jusqu'au sacrifice;
- manifestation de la toxicité par sexe et par dose, y compris indices d'accouplement, de fécondité, de gestation, de natalité, de viabilité et d'allaitement; le rapport doit mentionner les chiffres ayant servi au calcul de ces indices;
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, la descendance, la croissance postnatale, etc.;
- observations à l'autopsie;
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques;
- nombre de femelles P et F1 ayant un cycle normal et durée du cycle;
- nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles, pourcentage de spermatozoïdes à morphologie normale et pourcentage de spermatozoïdes par anomalie identifiée;
- temps écoulé jusqu'à l'accouplement, exprimé en nombre de jours;
- durée de la gestation;
- nombre d'implantations, de corps jaunes, taille de la portée;
- nombre de naissances vivantes et de pertes postimplantatoires;
- nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques; nombre de rabougris s'il a été déterminé;
- paramètres physiques évalués sur les petits et autres données sur le développement postnatal; il y a lieu de justifier les paramètres physiques évalués;
- observations fonctionnelles réalisées sur les petits et sur les adultes, suivant le cas;
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Discussion

Conclusions, y compris valeurs de la DSET pour les effets sur la mère et sur les petits.

4 BIBLIOGRAPHIE

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In : *Reproduction in Mammals : I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12 :92-108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54 :103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5 :39-44.
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog : a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3) :237- 244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6 :267-273
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats : an In Vitro Demonstration. *Journal of Andrology* 13 :409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis : Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5 :449-458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In : *Methods in Toxicology, Part A.*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration : Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10 : 401-415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8 :330-337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6 :491-505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17 :298303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In : *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
- (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In : *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5 :379-383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In : *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In : *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity : A Risk Assessment Approach. In : *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In : *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

Annexe 1H

« B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE : ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

1. METHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 429 (2002) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

L'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) a été suffisamment validé et accepté pour pouvoir être adopté en tant que nouvelle méthode (1) (2) (3). Il s'agit, en l'occurrence, de la deuxième méthode permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée des substances chimiques chez les animaux. L'autre méthode (B.6) fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (4).

L'ELGL offre un autre moyen d'identifier les produits chimiques qui exercent une action sensibilisante sur la peau et de confirmer que certaines substances sont dépourvues de pouvoir sensibilisant significatif. Cela ne signifie pas pour autant que l'ELGL doive systématiquement remplacer l'essai sur le cobaye, mais plutôt qu'il s'agit d'une méthode tout aussi valable, pouvant être utilisée à la place de ce dernier, et dont les résultats, qu'ils soient positifs ou négatifs, n'ont généralement pas besoin d'être reconfirmés.

L'ELGL présente certains avantages ressortissant au progrès scientifique et à la protection des animaux. Il étudie la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer l'effet en fonction de la dose. Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (5)(6)(7)(8). Il est également utile de noter que les sensibilisants légers à modérés recommandés comme témoins positifs dans les essais sur les cobayes conviennent aussi à l'ELGL (6)(8)(9).

L'ELGL, qui est une méthode *in vivo*, ne met pas un terme à l'utilisation des animaux dans l'évaluation de la sensibilisation par contact. Il peut, en revanche, diminuer le nombre d'animaux mobilisés à cette fin. De plus, l'ELGL améliore nettement la façon dont les animaux sont utilisés pour éprouver la sensibilisation par contact. L'ELGL se fonde sur l'observation de phénomènes immunologiques stimulés par des produits chimiques durant la phase d'induction de la sensibilisation. Avec l'ELGL, contrairement aux essais sur cobayes, il n'est pas nécessaire de déclencher des réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition provocatrice. En outre, l'ELGL ne requiert pas d'adjuvant, à la différence de l'essai de maximisation sur les cobayes. Ainsi, l'ELGL diminue la souffrance infligée aux animaux. Malgré les avantages de l'ELGL par rapport aux essais classiques sur les cobayes, il faut reconnaître qu'il présente certaines limites imposant parfois le recours aux essais classiques sur cobayes (par exemple, des résultats faussement négatifs avec certains métaux, des résultats faussement positifs avec certains produits irritants pour la peau) (10).

Voir également Introduction, partie B.

1.2 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

L'ELGL repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans le ganglion lymphatique qui draine le site de l'application de la substance chimique. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée (et à la puissance de l'allergène) et permet d'obtenir facilement une mesure objective et quantitative de la sensibilisation. L'ELGL évalue cette prolifération d'après l'effet produit en fonction de la dose, en comparant les groupes d'essai aux groupes témoins traités par le véhicule. On détermine le rapport de la prolifération dans les groupes d'essai et de la prolifération observée dans les groupes témoins traités par le véhicule, dit indice de stimulation, lequel doit être au moins égal à trois pour que la substance d'essai continue d'être évaluée en tant que sensibilisant cutané potentiel. Les méthodes décrites ici mesurent la prolifération cellulaire à l'aide d'un marquage radioactif. Cependant, il est possible d'employer d'autres critères pour évaluer la prolifération, à condition que ce choix soit étayé par des données scientifiques pertinentes, notamment la citation de passages complets et une description de la méthode.

1.3 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.3.1 Préparations

1.3.1.1 Conditions d'hébergement et d'alimentation

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et rester de préférence inférieure à 70 pour cent, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

1.3.1.2 Préparation des animaux

Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le début du traitement, afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

1.3.2 Conditions expérimentales :

1.3.2.1 Animaux d'expérience

L'espèce retenue pour cet essai est la souris. On utilise de jeunes femelles adultes de la souche CBA/Ca ou CBA/J, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux doivent être âgés de 8 à 12 semaines; l'écart de poids entre les animaux doit être minime et ne doit pas dépasser 20 pour cent du poids moyen. D'autres souches ainsi que des mâles pourront être utilisés s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL.

1.3.2.2 Test de fiabilité

Les témoins positifs servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai et la capacité du laboratoire à réaliser correctement cet essai. Le témoin positif devrait réagir positivement à l'ELGL à un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation (IS) >3 par rapport au groupe de témoins négatifs. La dose administrée aux témoins positifs devrait être choisie de telle sorte que l'induction soit claire mais pas excessive. Les substances préférées sont l'aldéhyde hexylcinnamique (N° CAS : 101-86-0, N° EINECS : 202-983-3) et le mercaptobenzothiazole (N° CAS : 149-30-4, N° EINECS : 205-736-8). Dans certains cas, d'autres substances témoins répondant aux critères susmentionnés pourront être employées, à condition que ce choix soit correctement justifié. Bien qu'il faille, en principe, inclure un groupe de témoins positifs dans chaque essai, certains laboratoires d'essai disposent de données antérieures sur des témoins positifs, qui permettent de montrer la constance d'une réaction satisfaisante sur une période de six mois ou plus. Dans ce cas, l'expérimentateur pourra espacer l'incorporation des témoins positifs, en respectant un intervalle maximal de six mois. Quoique la substance utilisée comme témoin positif doive être testée dans un véhicule

déclenchant une réaction constante (par exemple acétone, huile d'olive), certaines situations réglementaires exigeront aussi l'essai d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent). Dans ces circonstances, il y a lieu de tester également l'interaction éventuelle entre une substance servant de témoin positif et ce véhicule inhabituel.

1.3.2.3 Nombre d'animaux, choix des doses et du véhicule

Chaque groupe d'essai comprend au moins quatre animaux sur lesquels on teste au moins trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe de témoins négatifs traités seulement avec le véhicule de la substance d'essai et, au besoin, un témoin positif. S'il faut recueillir des données individuelles sur les animaux, les groupes d'essai compteront au moins cinq animaux. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins doivent être manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

La sélection des doses et du véhicule s'effectue conformément aux recommandations données en référence (1). Les doses sont choisies parmi la série de concentrations suivante : 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % etc. Le cas échéant, on tiendra compte des données existantes concernant la toxicité aiguë et l'irritation cutanée en sélectionnant les trois concentrations consécutives, de telle façon que la concentration la plus élevée maximise l'exposition tout en évitant la toxicité systémique et une irritation cutanée locale excessive (2) (11).

On choisira le véhicule en fonction de sa capacité à maximiser les concentrations d'essai et la solubilité ainsi qu'à produire une solution ou une suspension se prêtant à l'application de la substance d'essai. Par ordre de préférence, les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1 v/v), le diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (2) (10), mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclameront un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veillera tout particulièrement à ce que les matières hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui humidifie la peau et ne ruisselle pas immédiatement. Il conviendra donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

1.3.3 Mode opératoire

1.3.3.1 Programme expérimental

Le programme expérimental se déroule comme suit :

- *Premier jour :*

Mesurer et consigner le poids de chaque animal. Application de 25 µl de la dilution appropriée de la substance d'essai, du véhicule seul, ou du témoin positif (le cas échéant), sur le dos de chaque oreille.

- *Deuxième et troisième jours :*

Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.

- *Quatrième et cinquième jours :*

Pas de traitement.

- *Sixième jour :*

Noter le poids de chaque animal. Injecter 250 µL de tampon phosphate contenant 20 µCi (7,4e + 8Bq) de ³H-méthylthymidine dans la veine caudale de toutes les souris traitées et témoins. Il est également possible d'injecter 250 µL de solution tampon phosphate contenant 2 µCi (7,4e + 7Bq) de ¹²⁵I-iododéoxyuridine et de la fluorodéoxyuridine 10⁻⁵M dans la veine caudale de toutes les souris.

Cinq heures plus tard, les animaux sont sacrifiés. Après avoir excisé les ganglions rétro-auriculaires de chaque oreille de tous les animaux d'un groupe expérimental, on réunit ces ganglions dans un tampon phosphate (approche collective au niveau d'un groupe d'essai); on peut également exciser les paires de ganglions rétro-auriculaires de chaque animal et les mettre en suspension individuellement dans un tampon phosphate (méthode individuelle au niveau d'un animal). Les détails et les diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions sont repris à l'annexe I de la référence 10.

1.3.3.2 Préparation des suspensions cellulaires

L'expérimentateur préparera une suspension contenant les cellules des ganglions lymphatiques de tout un groupe ou d'un seul animal en pratiquant une séparation mécanique douce à travers une toile en acier inoxydable dont les mailles mesurent 200 µm. Les cellules de ganglions lymphatiques sont lavées deux fois avec un excès de tampon phosphate et précipitées avec de l'acide trichloracétique à 5 pour cent à 4 °C pendant 18 heures (1). Les culots sont soit remis en suspension dans 1 mL d'acide trichloracétique puis transférés dans des flacons à scintillation contenant 10 mL de scintillateur liquide pour le comptage du tritium ³H, soit directement transférés dans des tubes compteurs de rayons gamma pour le comptage de l'iode ¹²⁵I.

1.3.3.3 Mesure de la prolifération cellulaire (radioactivité incorporée)

L'incorporation de ³H-méthylthymidine se mesure par comptage de scintillations β, en désintégrations par minute (DPM). L'incorporation de ¹²⁵I-iododéoxyuridine se mesure par comptage de l'Iode ¹²⁵I et s'exprime également en DPM. Suivant la méthode choisie, l'incorporation sera exprimée en DPM/groupe d'essai (méthode collective au niveau d'un groupe) ou en DPM/animal traité (méthode individuelle au niveau d'un animal).

1.3.3.4 Observations

1.3.3.4.1 Observations cliniques

Une fois par jour, l'expérimentateur examinera attentivement les animaux afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou par une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées, et ce pour chaque animal séparément.

1.3.3.4.2 Poids corporel

Comme indiqué au paragraphe 1.3.3.1, le poids corporel de chaque animal est relevé au début de l'essai et au moment prévu du sacrifice.

1.3.4 Calcul des résultats :

Les résultats sont exprimés par l'indice de stimulation (IS). Si l'on utilise la méthode collective, l'indice de stimulation s'obtient en divisant la radioactivité incorporée globalement pour chaque groupe traité par la substance d'essai par la radioactivité incorporée globalement pour le groupe témoin traité par le véhicule; ce rapport livre un indice de stimulation moyen. Dans le cas de la méthode individuelle, l'IS est obtenu en divisant la moyenne DPM/animal de chaque groupe traité par la substance d'essai et celle du groupe témoin positif par la moyenne DPM/animal du groupe témoin traité par le véhicule. L'indice de stimulation moyen pour les témoins traités par le véhicule est alors égal à 1.

L'utilisation de la méthode individuelle pour calculer l'IS permet d'effectuer une analyse statistique des données. Pour choisir une méthode d'analyse statistique appropriée, l'expérimentateur doit être conscient du risque d'inégalité des variances et des autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Une bonne façon d'interpréter les données consiste à évaluer toutes les données individuelles des groupes d'essai et des groupes traités par le véhicule, afin d'en tirer la meilleure courbe d'ajustement de la relation dose-effet, compte tenu des intervalles de confiance (8)(12)(13). L'expérimentateur doit toutefois être attentif aux réactions « atypiques » possibles de certains animaux au sein d'un groupe, qui pourraient nécessiter le recours à une autre mesure de la réaction (par exemple, la médiane au lieu de la moyenne) ou l'élimination de la réaction atypique.

Pour qu'une réaction puisse être considérée comme positive, il faut que l'indice de stimulation soit ≥ 3 , tenir compte de la relation dose-effet et, s'il y a lieu, de la signification statistique (3)(6)(8)(12)(14).

Si les résultats obtenus ne sont pas assez concluants, on examinera les diverses propriétés de la substance d'essai, notamment afin de savoir si elle présente une similitude structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, si elle déclenche une irritation cutanée excessive, ainsi que la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont débattues en détail dans un autre document (7).

2 RESULTATS

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux montrant les valeurs de DPM moyennes et individuelles et les indices de stimulation pour chaque groupe d'essai (y compris le groupe de témoins traités par le véhicule).

3 RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- données d'identification (par exemple numéro CAS, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot);
- état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité);
- s'il s'agit d'un mélange : composition et pourcentages relatifs des constituants.

Véhicule :

- données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé);
- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience :

- souche de souris utilisée;
- état microbiologique des animaux, s'il est connu;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions expérimentales :

- détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai;
- justification du choix de la dose, y compris résultats d'une étude d'établissement de la gamme de doses, le cas échéant; concentrations du véhicule et de la substance d'essai et quantité totale de substance appliquée;
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau de boisson (notamment le type de régime alimentaire, sa source et la source d'eau de boisson).

Test de fiabilité :

- résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment les informations sur la substance, sa concentration et le véhicule utilisé;
- données antérieures ou concomitantes relatives aux témoins positifs et négatifs utilisés dans les laboratoires d'essai.

Résultats :

- poids individuel des animaux au début de l'essai et au moment programmé du sacrifice;
- tableau des valeurs de DPM moyennes (méthode collective) ou individuelles (méthode individuelle) ainsi que les échelles des valeurs pour les deux méthodes et indices de stimulation pour chaque groupe d'essai (y compris le groupe de témoins traités par le véhicule);
- analyse statistique, si nécessaire;
- moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris irritation cutanée au niveau du site d'application, pour chaque animal.

Discussion des résultats :

- Bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

4 BIBLIOGRAPHIE

- 1 Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions : A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165-169.
- 2 Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay : developments and applications. *Toxicology*, 93, 13-31.
- 3 Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay : An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563-79.
- 4 Méthode d'essai B.6.
- 5 Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay : status of validation. *Food and Chemical Toxicology* 34, 999-1002.
- 6 Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985-997.
7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 327-33.
- 8 Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay : employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49-59.
- 9 Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Food and Chemical Toxicology*, 18, 281-4.
- 10 National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay : A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds : The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No : 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11 Méthode d'essai B.4.
- 12 Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63-67.
- 13 Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261-266.
- 14 Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42,344-48.

B.43. ETUDE DE NEUROTOXICITE CHEZ LES RONGEURS

1. METHODE

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 424 (1997) de l'OCDE.

Cette méthode d'essai a été conçue dans le but de recueillir des données permettant de confirmer ou de mieux caractériser la neurotoxicité potentielle d'une substance pour des animaux adultes. Elle peut être utilisée en association avec d'autres méthodes d'essai dans le cadre d'études de toxicité à dose répétée ou seule, en tant qu'étude indépendante. Il est recommandé de consulter le Document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies d'essais en matière de neurotoxicité (1). Cette recommandation est particulièrement importante lorsqu'on envisage de s'écarter des observations et des protocoles d'essai préconisés dans cette méthode. Le document d'orientation est également utile pour choisir un protocole d'essai adapté à un cas spécifique.

La présente méthode ne s'applique pas à l'évaluation de la neurotoxicité au stade du développement.

1.1 INTRODUCTION

Dans l'évaluation des propriétés toxiques d'un produit chimique, il est important de prendre en considération la possibilité d'effets neurotoxiques. La méthode d'essai concernant la toxicité systémique à dose répétée permet déjà un premier tri des substances potentiellement neurotoxiques. La présente méthode peut être utilisée pour obtenir des informations complémentaires sur les effets neurotoxiques observés dans les études de toxicité systémique à dose répétée, et éventuellement pour confirmer ces effets. Cependant, la neurotoxicité potentielle de substances appartenant à certaines catégories pourra être évaluée de façon plus appropriée en appliquant directement la présente méthode, sans recueillir au préalable les indications qui peuvent être fournies par les études de toxicité systémique à dose répétée. Ce sera notamment le cas lorsque :

- des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée, ou
- lorsque les substances présentent des similitudes de structure ou ont d'autres caractéristiques en commun avec des substances neurotoxiques connues.

Cette méthode peut aussi être utile dans d'autres cas; voir référence (1) pour plus de détails.

Cette méthode a été conçue de manière à pouvoir être adaptée, en fonction des besoins spécifiques, aussi bien pour confirmer la neurotoxicité histopathologique d'une substance chimique ou sa neurotoxicité sur le plan du comportement, que pour caractériser et quantifier les neurotoxiques.

Autrefois, la neurotoxicité était assimilée à une forme de neuropathie englobant des lésions neuropathologiques ou des dysfonctionnements neurologiques tels que apoplexie, paralysie ou tremblements. Bien que la neuropathie soit une manifestation importante de la neurotoxicité, il apparaît aujourd'hui clairement qu'il existe de nombreux autres signes de toxicité pour le système nerveux (par exemple, perte de la coordination motrice, déficits sensoriels, diminution de la faculté d'apprentissage et de la mémoire) qui ne sont pas toujours mis en évidence par les études neuropathologiques ou autres.

La présente méthode d'essai de neurotoxicité vise à détecter, chez les rongeurs adultes, les effets importants sur le comportement et les effets neuropathologiques. Bien que des effets sur le comportement, même s'ils ne sont pas accompagnés de changements morphologiques, puissent révéler un impact néfaste sur l'organisme, les changements de comportement ne sont pas tous spécifiques du système nerveux. Par conséquent, tout changement observé doit être évalué par rapport aux données histopathologiques, hématologiques ou biochimiques correspondantes et aux résultats d'autres études de toxicité systémique. Les essais préconisés par la présente méthode pour caractériser et quantifier les réponses neurotoxiques comprennent des procédures histopathologiques et des procédures spécifiquement axées sur le comportement, qui pourront être étayées par des études électrophysiologiques et/ou biochimiques (1)(2)(3)(4).

Les agents neurotoxiques peuvent agir sur différentes cibles dans le système nerveux et cela, par différents mécanismes. Comme il est impossible de concevoir une seule série d'essais permettant d'évaluer de manière approfondie le potentiel neurotoxique de toutes les substances, il peut s'avérer nécessaire de mettre en œuvre d'autres essais *in vivo* ou *in vitro* spécifiques du type de neurotoxicité observé ou escompté.

La présente méthode d'essai peut également servir, en association avec le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies et les méthodes d'essais en matière de neurotoxicité, à concevoir des études destinées à mieux caractériser la relation dose-effet ou à en améliorer la sensibilité, en vue d'obtenir une meilleure estimation de la concentration sans effet nocif observé ou de mettre en évidence les dangers connus ou suspectés de la substance. On peut ainsi concevoir des études pour identifier et évaluer le ou les mécanisme(s) neurotoxiques ou pour compléter des données déjà fournies par l'application de protocoles de base d'observations du comportement et d'observations neuropathologiques. Lors de ces études, il est inutile de chercher à obtenir en double des données qui seraient de toute façon obtenues en suivant les protocoles préconisés par cette méthode, si ces données sont déjà disponibles et ne sont pas nécessaires pour l'interprétation des résultats de l'étude.

Les informations recueillies dans cette étude de neurotoxicité, qu'elle soit réalisée de façon indépendante ou couplée à d'autres études, permettent de :

- déterminer si les effets de la substance chimique sur le système nerveux sont permanents ou réversibles;
- mieux caractériser les altérations du système nerveux qui sont liées à l'exposition à la substance et faciliter la compréhension du mécanisme sous-jacent;
- déterminer les relations entre dose et effet et entre temps et effet afin de pouvoir estimer la concentration sans effet nocif observé (laquelle pourra servir à établir les critères de sécurité de la substance).

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. Si d'autres voies, comme la voie dermique ou l'inhalation, paraissent plus appropriées, des modifications des procédures recommandées s'imposent. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles.

1.2 DEFINITIONS

Effet nocif : toute altération par rapport à une situation de référence, qui est due au traitement et qui diminue l'aptitude d'un organisme à survivre, se reproduire ou s'adapter à l'environnement.

Dose : la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids (g, mg) de substance d'essai ou en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration dans le régime (ppm).

Dosage : un terme général qui comprend la dose, la fréquence et la durée de l'administration.

Neurotoxicité : une altération de la structure ou de la fonction du système nerveux qui est la conséquence d'une exposition à un agent chimique, biologique ou physique.

Agent neurotoxique : tout agent chimique, biologique ou physique capable d'induire une neurotoxicité.

CSENO : concentration maximale sans effet nocif observé, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif imputable au traitement n'est observé.

1.3 PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de rongeurs. L'administration se fait généralement à doses répétées sur une période qui peut être de 28 jours, de 90 jours (étude subchronique) ou d'une année ou plus (étude chronique). Les procédures décrites dans cette méthode peuvent également être appliquées dans le cas d'une étude de neurotoxicité aiguë. Les animaux sont soumis à l'essai afin de détecter ou de caractériser des anomalies de comportement ou d'ordre neurologique. Au cours de chaque période d'observation, différents aspects du comportement qui pourraient être indicatifs d'une atteinte neurotoxique sont évalués. A la fin de l'essai, une partie des animaux de chaque groupe et de chaque sexe sont perfusés *in situ* et des coupes du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs périphériques sont préparées et examinées.

Lorsque l'étude est conduite de façon indépendante pour dépister une neurotoxicité ou caractériser des effets neurotoxiques, les animaux de chaque groupe qui ne sont pas utilisés pour la perfusion et l'examen histopathologique (voir Tableau 1) peuvent servir pour des examens du comportement et des examens neuropathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques qui permettent de compléter les données recueillies dans les observations de base préconisées par la présente méthode (1). Ces examens complémentaires peuvent être particulièrement utiles lorsque des observations empiriques ou des effets escomptés laissent prévoir un type spécifique de neurotoxicité ou une cible spécifique pour cette neurotoxicité. Une autre possibilité est d'utiliser les animaux restants dans des évaluations telles que celles qui sont préconisées par les méthodes d'essai de toxicité à doses répétées chez les rongeurs.

Lorsque les procédures de la présente méthode d'essai sont combinées avec celles d'autres méthodes, il faut prévoir un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir effectuer les observations requises par les deux études.

1.4 DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1 Choix de l'espèce animale

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées moyennant justification du choix. Il convient de recourir aux souches couramment utilisées en laboratoire. Les animaux doivent être adultes, jeunes et sains. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration des doses doit débuter aussitôt après le sevrage, de préférence avant que les animaux n'atteignent l'âge de six semaines et en tout état de cause avant neuf

semaines. Cependant, lorsque la présente étude est couplée à d'autres études, cette limite d'âge peut faire l'objet d'un ajustement. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne doivent pas dépasser plus ou moins 20 pour cent du poids moyen des animaux du même sexe. Si une étude de toxicité orale à dose répétée de faible durée est réalisée en tant qu'essai préliminaire avant une étude à long terme, il faut utiliser des animaux de même souche et de même provenance dans les deux études.

1.4.2 Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et rester de préférence inférieure à 70 pour cent, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les bruits forts intermittents doivent être réduits au minimum. Pour l'alimentation des animaux, on pourra utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Le choix du régime peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux peuvent être placés dans des cages soit individuellement, soit par petits groupes du même sexe.

1.4.3 Préparation des animaux

Des animaux jeunes et sains sont choisis au hasard pour être répartis entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de manière à minimiser les effets possibles dus à l'agencement des cages. Les animaux sont marqués individuellement afin de permettre leur identification. Ils sont maintenus dans les cages pendant cinq jours au moins avant le début de l'étude pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.4 Voies d'administration et préparation des doses

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. La substance à tester peut être administrée par gavage ou en capsules ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson. D'autres voies d'administration (par ex. voie dermique ou inhalation) peuvent être utilisées, mais nécessiteront le cas échéant des modifications du mode opératoire. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles. Le choix de la voie d'administration, ainsi que les éventuelles modifications du mode opératoire doivent être justifiés.

Si nécessaire, la substance d'essai peut être dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé de privilégier les solutions ou suspensions aqueuses. A défaut, on peut utiliser une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple) et, en dernier recours, une solution dans d'autres véhicules. Lorsque le véhicule n'est pas aqueux, il faut en connaître les propriétés toxiques. D'autres caractéristiques du véhicule peuvent avoir de l'importance, notamment des éventuels effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, pouvant agir sur les propriétés toxiques de celle-ci, et des effets sur la consommation de nourriture ou d'eau ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5 MODE OPERATOIRE

1.5.1 Nombre et sexe des animaux

Lorsqu'il s'agit d'une étude indépendante, il faut utiliser au moins vingt animaux (dix femelles et dix mâles) dans chaque groupe de traitement et dans chaque groupe témoin pour les observations cliniques et fonctionnelles. A la fin de l'étude, au moins cinq mâles et cinq femelles sont prélevés parmi ces dix mâles et ces dix femelles pour être perfusés *in situ* et soumis à un examen neuro-histopathologique. Lorsque dans un groupe de dosage, les observations visant à détecter les effets neurotoxiques ne sont réalisées que sur un nombre limité d'animaux, il convient que ces animaux fassent partie de ceux qui seront choisis pour être perfusés. Si l'étude est combinée avec une étude de toxicité à doses répétées, le nombre des animaux doit être suffisant pour que les objectifs des deux études puissent être atteints. Le Tableau 1 donne les nombres minimaux d'animaux par groupe pour différentes combinaisons d'études. S'il est prévu de sacrifier des animaux avant le terme de l'étude ou de constituer des groupes pour observer la réversibilité des effets, leur persistance ou l'apparition différée d'effets toxiques après traitement, ou si des observations complémentaires sont envisagées, il faut augmenter le nombre d'animaux pour s'assurer que le nombre requis pour les observations et les examens histopathologiques sera disponible.

1.5.2 Groupes de traitement et groupes témoins

En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes d'animaux traités et d'un groupe témoin. Cependant, s'il ressort de l'évaluation d'autres données qu'aucun effet n'est à attendre d'une administration répétée à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, on peut procéder à un essai limite. Si l'on ne dispose pas de données adéquates, on peut mener une étude préliminaire visant à délimiter la gamme des niveaux de doses à utiliser. A l'exception de l'exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités exactement de la même manière que les animaux des groupes de traitement. Si la substance à tester est incorporée dans un véhicule, le groupe témoin doit en recevoir un volume égal au plus grand volume utilisé dans les groupes de traitement.

1.5.3 Contrôle de la fiabilité

Le laboratoire chargé de l'étude doit présenter des données attestant de sa capacité à réaliser l'étude et prouvant la sensibilité des méthodes employées. Ces données doivent constituer une preuve évidente de la faculté du laboratoire à détecter et, le cas échéant, à quantifier, les changements observés pour les différents critères d'évaluation, notamment réactions neurovégétatives, réactivité sensorielle, force de préhension et activité motrice. Les références 2 à 9 contiennent des informations sur les substances qui provoquent différents types de réponses neurotoxiques et qui peuvent servir de témoins positifs. Des données antérieures peuvent également être utilisées à condition que les principaux éléments des procédures expérimentales soient restés les mêmes. Des mises à jour périodiques de ce type de données sont recommandées. Chaque fois que le laboratoire modifie un élément essentiel du mode opératoire ou des méthodes employées, de nouvelles données doivent être réunies pour démontrer que la sensibilité des procédures est maintenue.

1.5.4 Choix des doses

Les niveaux de dose doivent être choisis en fonction des données disponibles concernant la toxicité et la toxico-cinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. La dose la plus élevée est choisie dans le but de provoquer des effets neurotoxiques ou des effets de toxicité systémique manifeste. Il faut ensuite choisir une série de doses décroissantes de façon à mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et l'absence d'effets nocifs observables au niveau de la dose la plus faible (CSENO). En principe, les niveaux de doses doivent être choisis de telle manière que l'on puisse distinguer les effets neurotoxiques primaires des effets liés à la toxicité systémique. Deux à trois intervalles entre niveaux successifs représentent fréquemment la meilleure solution et il est souvent préférable d'ajouter un quatrième groupe d'essai plutôt que de fixer des intervalles trop espacés (par exemple dépassant un facteur dix) entre les niveaux de dose. Lorsque des estimations réalistes de l'exposition humaine existent, il faut en tenir compte.

1.5.5 Essai limite

Si une étude réalisée à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour selon la méthode décrite ci-dessus ne provoque aucun effet toxique observable, et que d'après les données obtenues pour des composés de structure analogue, il est peu probable que la substance testée soit toxique, on peut considérer qu'il est inutile d'effectuer une étude complète sur trois niveaux de dose. En fonction de l'exposition humaine escomptée, il pourra s'avérer nécessaire d'administrer une dose plus forte par voie orale pour l'essai limite. Pour les autres voies d'administration, comme l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physiques et chimiques de la substance qui déterminent le niveau d'exposition maximal. Dans le cas d'une étude orale aiguë, la dose de l'essai limite doit être au moins 2 000 mg/kg.

1.5.6 Administration des doses

La substance à tester est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours par semaine, sur une période d'au moins 28 jours. L'administration à raison de cinq jours par semaine ou l'adoption d'une période d'exposition plus courte demandent à être justifiées. Lorsque la substance est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'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 dépasser 1 ml/100 g de poids corporel. Toutefois, dans le cas d'une solution aqueuse, il est possible d'utiliser jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite pour les substances irritantes ou corrosives, qui donneraient normalement lieu à des effets fortement amplifiés à des concentrations plus élevées, il convient de minimiser les variations du volume administré en ajustant la concentration de façon à maintenir un volume constant à tous les niveaux de dose.

Lorsque la substance est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il importe que les quantités de substance utilisées ne modifient pas les bilans nutritionnels ou hydriques normaux. Lorsque la substance est administrée dans la nourriture, deux possibilités sont offertes : soit le maintien d'une concentration constante (exprimée en ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. L'option choisie doit être précisée. Lorsque la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à la même heure et la quantité doit être ajustée de manière à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'un essai à dose répétée sert d'étude préliminaire à une étude à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études. Pour les études de toxicité aiguë, si la dose ne peut être administrée en une seule fois, il est possible de la fractionner sur une période n'excédant pas 24 heures.

1.6 OBSERVATIONS

1.6.1 Fréquence des observations et essais

Dans les études à doses répétées la période d'observation doit s'étendre sur toute la période de traitement. Dans les études de toxicité aiguë, les observations sont poursuivies pendant 14 jours après le traitement. Les animaux de groupes satellites (qui ne sont pas exposés pendant une certaine période après le traitement) sont observés également pendant 14 jours.

Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour favoriser la détection de toute anomalie de comportement ou d'ordre neurologique. Les observations se font de préférence aux mêmes moments chaque jour, en tenant compte de la période au cours de laquelle les effets escomptés du traitement seront les plus marqués. Le Tableau 2 récapitule la fréquence des observations cliniques et des tests fonctionnels. Si des données de cinétique et autres, obtenues dans des études antérieures, indiquent que d'autres moments de la journée sont plus propices aux observations, essais ou observations après traitement, il y a lieu d'adopter un échancier différent afin de recueillir le plus d'informations possible. Les modifications de l'échancier doivent être justifiées.

1.6.1.1 Surveillance de l'état de santé général et relevés de mortalité/morbidité

Tous les animaux font l'objet d'un examen minutieux au moins une fois par jour pour vérifier leur état de santé, et des relevés de la morbidité et de la mortalité sont effectués au moins deux fois par jour.

1.6.1.2 Observations cliniques détaillées

Tous les animaux choisis pour être soumis à un examen clinique approfondi (voir Tableau 1) subissent cet examen une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même individu) et à divers intervalles par la suite, en fonction de la durée de l'étude (voir Tableau 2). Les groupes satellites destinés à l'observation de la réversibilité des effets sont examinés à la fin de la période de récupération. Ces examens doivent être effectués hors de la cage habituelle, sur une aire standard. Les résultats doivent être soigneusement consignés, de préférence à l'aide de systèmes de cotation utilisant des critères ou d'échelles de cotation, pour chaque mesure effectuée. Les critères ou échelles employés doivent être explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai (mis à part celles qui sont liées au traitement) et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs expérimentés n'ayant pas connaissance du traitement administré.

Il est recommandé procéder de manière structurée en appliquant systématiquement, pour chaque animal et à chaque moment d'observation, des critères bien définis. Les données utilisées pour définir le niveau normal doivent être présentées. Tous les signes observés doivent être consignés. L'ampleur des signes observés est également consignée chaque fois que cela est possible. Les observations cliniques devraient notamment porter sur les modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives (sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, rythme respiratoire inhabituel, respiration par la bouche, tous signes inhabituels de miction ou défécation, urine décolorée, par exemple).

Il convient également de consigner toute réaction inhabituelle en ce qui concerne la position du corps, le niveau d'activité (par exemple, exploration accrue ou diminuée de l'aire standard) et la coordination des mouvements. Il convient également de consigner les modifications dans la démarche (dandinement, ataxie, par exemple), dans la posture (dos arrondi, par exemple) et la réaction à la manipulation, au placement et autres stimuli, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, les convulsions et tremblements, les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou les comportements bizarres (par exemple, tendance à mordre, léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation) ou l'agressivité.

1.6.1.3 Tests fonctionnels

Comme dans le cas des observations cliniques, les tests fonctionnels sont réalisés sur tous les animaux sélectionnés à cet effet (voir Tableau) une fois avant l'exposition et fréquemment ensuite. La fréquence des tests fonctionnels dépend également de la durée de l'étude (voir Tableau 2). En plus des périodes d'observation stipulées dans le Tableau 2, des observations fonctionnelles sont réalisées sur des groupes satellites aussi près que possible du sacrifice final. Les tests fonctionnels explorent notamment la réactivité sensorielle à divers stimuli [par exemple, stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs] (5)(6)(7), la force de préhension (8) et l'activité motrice (9). Cette dernière doit être mesurée à l'aide d'un dispositif automatique pouvant détecter aussi bien les hausses que les baisses d'activité. Si un autre système défini est

utilisé, il doit être quantitatif et de sensibilité et fiabilité démontrées. Chaque dispositif doit être testé afin de garantir sa fiabilité au cours du temps et la cohérence des résultats d'un dispositif à l'autre. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. En l'absence d'informations sur le potentiel neurotoxique (par ex., informations sur la relation structure-activité, données épidémiologiques, autres études toxicologiques), il convient d'envisager des tests plus spécialisés d'exploration des fonctions sensorielles et motrices ou de la mémoire et de la faculté d'apprentissage. La référence (1) fournit de plus amples informations sur les tests plus spécialisés et leur utilisation.

Exceptionnellement, les animaux qui montrent des signes de toxicité marqués qui risqueraient de fausser considérablement les résultats du test fonctionnel peuvent ne pas être soumis à ce test. La décision d'écarter des animaux d'un test fonctionnel doit être justifiée.

1.6.2 Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

Dans les études allant jusqu'à 90 jours, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. Il faut également mesurer la quantité de nourriture consommée (ou d'eau consommée, lorsque la substance est administrée par cette voie), au moins une fois par semaine. Dans les études à long terme, tous les animaux sont pesés au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et au moins une fois toutes les quatre semaines par la suite. La quantité de nourriture consommée (ou d'eau, si la substance est administrée par cette voie) doit être mesurée au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et à peu près tous les trois mois par la suite, à moins qu'une détérioration de l'état général ou un amaigrissement n'imposent d'autres conditions.

1.6.3 Ophtalmologie

Dans les études de plus de 28 jours, un examen ophtalmologique à l'aide d'un ophtalmoSCOPE ou d'un autre appareil approprié doit être effectué avant l'administration de la substance et au terme de l'étude. Cet examen est effectué de préférence sur tous les animaux et en tout état de cause au moins sur ceux du groupe ayant reçu la dose la plus forte ainsi que sur les animaux des groupes témoins. Si des altérations sont détectées dans les yeux, ou si des signes cliniques y incitent, l'examen est étendu à tous les animaux. Dans les études à long terme, un examen ophtalmologique est prévu après treize semaines. Des examens ophtalmologiques ne sont pas nécessaires si les informations pertinentes ont déjà été fournies par d'autres études de durée similaire réalisées à des doses comparables.

1.6.4 Hématologie et biochimie clinique

Lorsque l'étude de neurotoxicité est conduite en combinaison avec une étude de toxicité systémique à doses répétées, les examens hématologiques et les déterminations de biochimie clinique doivent être effectués comme prescrit par la méthode correspondante de l'étude de toxicité systémique. Les échantillons sont à prélever de telle façon que les effets possibles sur le comportement neurologique soient réduits au minimum.

1.6.5 Histopathologie

L'examen neuropathologique doit être conçu dans le but de compléter et d'approfondir les observations faites pendant la phase *in vivo* de l'étude. Les tissus d'au moins cinq animaux de chaque sexe et de chaque groupe (voir le Tableau 1 et le paragraphe suivant) doivent être fixés *in situ* à l'aide des techniques de perfusion et de fixation usuelles (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Tout changement important observable doit être consigné. S'il s'agit d'une étude indépendante, réalisée pour dépister une neurotoxicité ou pour caractériser des effets neurotoxiques, les animaux restants peuvent être utilisés pour des examens spécifiques du comportement neurologique (10)(11), des examens neuropathologiques (10)(11)(12)(13), neurochimiques (10)(11)(14)(15) ou électrophysiologiques pouvant éventuellement compléter les procédures et examens décrits ici, ou bien venir s'ajouter aux animaux soumis à l'examen histopathologique. Ces procédures complémentaires sont particulièrement utiles lorsque, à la suite d'observations empiriques ou sur la base des effets escomptés, on peut s'attendre à un type spécifique de neurotoxicité ou à une cible spécifique de celle-ci (2)(3). Ces animaux restants peuvent également servir dans les évaluations pathologiques de routine qui sont décrites dans la méthode à doses répétées.

Les échantillons de tissus sont colorés par une méthode usuelle, par exemple par de l'hématoxyline et de l'éosine, inclus dans de la paraffine et examinés sous le microscope. Si des signes de neuropathie périphérique sont observés ou en cas de suspicion de tels effets, il conviendra d'examiner des échantillons de tissu nerveux périphérique inclus dans du plastique. Certains signes cliniques peuvent également inciter à l'examen d'autres sites ou à l'utilisation de méthodes de coloration spéciales. Les références (3) et (4) fournissent des indications sur les sites supplémentaires à examiner. Des colorants spéciaux peuvent aussi être utiles pour mettre en évidence des types spécifiques d'altérations pathologiques (18).

Un examen histologique doit être réalisé sur des coupes représentatives du système nerveux central et périphérique (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Les sites examinés doivent normalement comprendre le cerveau antérieur, le centre des hémisphères cérébraux, comprenant une coupe de l'hippocampe, le cerveau central, le cervelet, la protubérance annulaire, le bulbe rachidien, l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière et les renflements cervicaux et lombaires, les ganglions de la chaîne dorsale, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au genou) et les ramifications du nerf tibial aux muscles du mollet. Les sections de la moelle épinière et des nerfs périphériques doivent comprendre des coupes transversales et longitudinales. Il faut accorder une attention particulière à la vascularisation du système nerveux. Un échantillon de muscles squelettiques, en particulier du mollet, devrait également être examiné. Une attention particulière devrait être accordée aux régions à structure cellulaire et fibreuse du système nerveux central et périphérique, qui sont connues pour être particulièrement sujettes aux attaques neurotoxiques.

Les références (3) et (4) fournissent des informations sur les altérations neuropathologiques typiquement liées aux expositions à une substance neurotoxique. Il est recommandé de procéder par étapes pour l'examen des échantillons de tissus, en comparant d'abord des coupes du groupe ayant reçu la forte dose avec des coupes du groupe témoin. Si aucune altération neuropathologique n'est constatée dans les échantillons de ces groupes, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'analyse. Si des altérations neuropathologiques apparaissent dans le groupe traité à la forte dose, il faut alors examiner successivement des échantillons de tous les tissus potentiellement affectés des groupes traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

Si l'examen qualitatif met en évidence des signes d'altérations neuropathologiques, il convient de procéder à un second examen de toutes les régions du système nerveux qui présentent ces altérations. Dans tous les groupes de dosage, il convient de réaliser des coupes de toutes les régions potentiellement affectées, qui seront ensuite codées, puis examinées à l'aveugle dans un ordre aléatoire. La fréquence et la gravité de chaque lésion sont consignées. Quand toutes les régions de tous les groupes ont été cotées, le code est cassé et une analyse statistique est faite afin de déterminer la relation dose-réponse. Il faut donner la description des différents degrés de gravité de chaque lésion.

Les résultats de l'examen neuropathologique doivent être évalués à la lumière des observations et déterminations fonctionnelles, ainsi que des résultats des études de toxicité systémique réalisées sur la substance.

2 RESULTATS

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Il faut présenter les résultats relatifs à chaque individu. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux montrant pour chaque groupe d'essai ou groupe témoin, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés au cours de l'essai, le moment de chaque décès ou sacrifice, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, une description de ces signes, y compris le moment de leur apparition, leur durée, leur type et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, le type de ces dernières et leur gravité.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats de l'étude doivent être évalués sur les plans de la fréquence, de la gravité et de la corrélation des effets neuropathologiques et de comportement (le cas échéant, neurochimiques et électrophysiologiques si des examens supplémentaires ont été pratiqués) avec d'autres effets nocifs observés. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique adéquate et communément acceptée. Les méthodes statistiques doivent être choisies au moment de la conception de l'étude.

3 RAPPORT

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après :

Substance d'essai :

- nature physique (y compris isomérisation, pureté et propriétés physico-chimiques);
- données permettant l'identification.

Véhicule (le cas échéant) :

- justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisées;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions de l'essai :

- description détaillée de la formulation de la substance à tester et/ou de la préparation alimentaire, concentration atteinte, stabilité et homogénéité de la préparation;
- précisions sur les doses administrées, le véhicule, le volume et la forme physique du mélange administré;
- précisions sur le mode d'administration de la substance à tester;
- justification du choix des niveaux de dose;
- justification du choix de la voie et de la durée d'exposition;
- conversion de la concentration (en ppm) de la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson en dose (en mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant;
- précisions sur la qualité des aliments et de l'eau.

Procédures d'observation et d'essais :

- précisions sur l'affectation des animaux de chaque groupe aux sous-groupes de perfusion;
- précisions sur les systèmes de cotation, les critères et les échelles utilisés pour chaque détermination lors des observations cliniques détaillées;
- précisions sur les tests fonctionnels d'exploration de la réactivité sensorielle à divers stimuli (par exemple stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs); précisions sur l'évaluation de la force de préhension; précisions sur l'évaluation de l'activité motrice (y compris détails sur les dispositifs automatiques de détection de l'activité) et sur les autres procédures;
- précisions sur les examens ophtalmologiques et, le cas échéant, hématologiques et sur les tests de biochimie clinique, avec indication des valeurs de référence;
- précisions sur les procédures spécifiques de recherche des modifications du comportement et des altérations neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques.

Résultats :

- poids corporel/variations du poids corporel et poids au moment du sacrifice;
- consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant;
- informations sur les réactions de toxicité, par sexe et par niveau de dose, y compris les symptômes de toxicité ou mortalité;
- nature, gravité et durée (moment du début et évolution observée) des observations cliniques détaillées (préciser si les effets sont réversibles ou non);
- description détaillée des résultats de tous les tests fonctionnels;
- résultats de l'autopsie
- description détaillée de toutes les observations concernant le comportement, les modifications neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques, le cas échéant;
- données concernant l'absorption et le métabolisme, si disponibles
- traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats :

- informations concernant la relation dose-réponse
- rapport entre tout autre effet toxique et une conclusion quant au potentiel neurotoxique de la substance
- concentration sans effet nocif observé.

Conclusions :

- une appréciation sur la neurotoxicité globale de la substance est demandée.

4 BIBLIOGRAPHIE

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris In Preparation.
2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60 : Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.
4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 726-742.
5. Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
7. Moser V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery : Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
8. Meyer O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments : Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.
11. Chang, L.W., ed.(1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.
12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689-695.
13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343-352.
14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, 445-452.
15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368-378.
16. Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In : *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299-335.
17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In : *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.
18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Praticce of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tableau 1 :

Nombres minimaux d'animaux requis par groupe selon que l'étude de neurotoxicité est conduite séparément ou en combinaison avec d'autres études

	ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CONDUITE COMME:			
	Étude séparée	Étude combinée avec une étude sur 28 jours	Étude combinée avec une étude sur 90 jours	Étude combinée avec une étude de toxicité chronique
Nombre total d'animaux par groupe	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	15 mâles et 15 femelles	25 mâles et 25 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels y compris les observations cliniques détaillées	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour la perfusion <i>in situ</i> et l'examen neuro-histopathologique	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les essais de toxicité à dose répétée, de toxicité subchronique et chronique, les études hématologiques, de biochimie clinique, histopathologiques, etc., comme indiqué dans les lignes directrices correspondantes				
Observations complémentaires, le cas échéant	5 mâles et 5 femelles		10 mâles [†] et 10 femelles [†]	20 mâles [†] et 20 femelles [†]

† - Ce nombre comprend cinq animaux sélectionnés pour les test fonctionnels et les observations cliniques détaillées faisant partie de l'étude de neurotoxicité

Tableau 2 :
Fréquence des observations cliniques et périodicité des tests fonctionnels

Type d'observation		Durée de l'étude			
		Étude de toxicité aiguë	28 jours	90 jours	Étude de toxicité chronique
Sur tous les animaux	État de santé général	quotidiennement	Quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement
	Mortalité/morbidité	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour
	Observations cliniques détaillées	- avant la première exposition - dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé - aux jours 7 et 14 après administration	- avant la première exposition - une fois par semaine ensuite	- avant la première exposition - une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition - une fois par mois ensuite	- avant la première exposition - une fois à la fin du premier mois d'exposition - tous les trois mois ensuite
Sur les animaux sélectionnés pour les observations fonctionnelles	Tests fonctionnels	- avant la première exposition - dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé - aux jours 7 et 14 après administration	- avant la première exposition - pendant la quatrième semaine du traitement le plus près possible de la fin de la période d'exposition	- avant la première exposition - une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition - une fois par mois ensuite	- avant la première exposition - une fois à la fin du premier mois d'exposition - tous les trois mois ensuite

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

»

Annexe II

« C.21. MICRO-ORGANISMES DU SOL : ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE »

1. METHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 216 (2000) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation de l'azote par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (3) de la SETAC (4) et de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (5), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (6), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (7) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate. Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation de l'azote est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués : l'essai de transformation de l'azote et l'essai de transformation du carbone. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification commerciaux (nitrapyrine), un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation de l'azote à la surface aérobie des sols. La méthode d'essai permet également d'estimer les effets des substances sur la transformation du carbone par la microflore du sol. La formation de nitrate se produit par suite de la dégradation des liaisons carbone-azote. Par conséquent, si l'on trouve des taux identiques de production de nitrate dans des sols traités et dans les sols témoins, il est très probable que les voies de dégradation principales du carbone soient intactes et fonctionnelles. Le substrat choisi pour l'essai (farine de luzerne en poudre) présente un bon rapport carbone-azote (généralement entre 12/1 et 16/1). De ce fait, la carence en carbone est réduite pendant l'essai et si la population microbienne est endommagée par une substance chimique, elle peut se reconstituer dans un délai de 100 jours.

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus avant tout pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple, des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux produits agrochimiques. En modifiant la quantité de substance d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on détermine les effets d'une série de concentrations sur la transformation de l'azote pour les substances chimiques autres que les produits agrochimiques. L'essai peut également être utilisé pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité qui pénètre dans le sol. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_x , où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2 DEFINITIONS

Transformation de l'azote : dégradation par des micro-organismes de la matière organique contenant de l'azote, par le processus d'ammonification et de nitrification, en son produit final, le nitrate inorganique.

CE_x (concentration produisant x % d'effet) : concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x pour cent d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet) : concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 pour cent (50 %) d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

1.3 SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4 PRINCIPE DE LA METHODE

Le sol tamisé est amendé avec de la farine végétale en poudre puis traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, des échantillons de sol traité et des échantillons témoins sont extraits avec un solvant approprié, et les quantités de nitrate présentes dans les extraits sont déterminées. Le taux de formation de nitrate dans les échantillons traités est comparé au taux des échantillons témoins, et l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin est calculé. Tous les essais durent au moins 28 jours. Si, au 28^{ème} jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures sont poursuivies pendant une durée maximale de 100 jours. Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série de concentrations de substance d'essai sont ajoutées aux échantillons de sol, et les quantités de nitrate formées dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont mesurées au bout de 28 jours d'incubation. Les résultats des essais avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne $\pm 25\%$) entre les concentrations en nitrate dans les échantillons témoins et les échantillons traités, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à $\pm 15\%$.

1.6 Description de la méthode

1.6.1 Appareillage

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire : incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le paragraphe 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échange gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches au gaz. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Le matériel courant de laboratoire suivant est utilisé :

- agitateur : agitateur mécanique ou équivalent;
- centrifugeuse (3000 g) ou appareil de filtration (avec du papier filtre sans nitrate);
- instrument de sensibilité et de reproductibilité adapté à l'analyse des nitrates.

1.6.2 Sélection et nombre de sols

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes :

- teneur en sable : supérieure à 50 % et inférieure à 75 %;
- pH : 5,5 - 7,5;
- teneur en carbone organique : 0,5 - 1,5 %;
- la biomasse microbienne doit être mesurée (8)(9) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques représente les conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

1.6.3 Prélèvement et stockage des échantillons de sol

1.6.3.1 Prélèvement

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement aux produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant le prélèvement des échantillons. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture et aucun échantillon de sol ne doit être prélevé que trois mois au moins après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais ayant des effets biocides connus (comme le cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâturage) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple).

Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2 Stockage

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois entre moins 18°C et moins 22°C . La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le paragraphe 1.6.2).

1.6.4 Manipulation et préparation du sol pour l'essai

1.6.4.1 Pré-incubation

Si le sol a été stocké (voir le paragraphe 1.6.3.2), il est recommandé de procéder à une pré-incubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la pré-incubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les paragraphes 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

1.6.4.2 Propriétés physico-chimiques

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon de sol doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.4.3 Amendement à l'aide d'un substrat organique

Le sol doit être amendé à l'aide d'un substrat organique approprié, comme de la farine de luzerne verte en poudre (composant principal : *Medicago sativa*) avec un rapport C/N situé entre 12/1 et 16/1. Le rapport luzerne-sol recommandé est de 5 g de luzerne par kilogramme de sol (poids sec).

1.6.5 Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie : 0,1-0,5mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme) car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6 Concentrations d'essai

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévu. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'une application. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x .

1.7 EXECUTION DE L'ESSAI

1.7.1 Conditions expérimentales

1.7.1.1 Traitement et contrôle

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées à l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois répliqués de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois répliqués de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage de l'échantillon de sol.

1.7.1.2 Incubation des échantillons de sol

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons : sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de répliqués utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les répliqués et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires d'échantillons du sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le paragraphe 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3 Conditions et durée de l'essai

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le paragraphe 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les taux de formation de nitrate dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si ceux-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours. En ce qui concerne les produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de nitrate dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

1.7.2 Prélèvement et analyse des sols

1.7.2.1 Echelonnement des prélèvements

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure du nitrate aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer le nitrate au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin de mesurer la quantité initiale de nitrate dans le sol.

1.7.2.2 Analyse des échantillons de sol

La quantité de nitrate formé dans chaque échantillon traité et dans chaque témoin est déterminée à chaque temps de prélèvement. Le nitrate est extrait du sol en agitant les échantillons en présence d'un solvant d'extraction, par exemple, une solution de 0,1 M de chlorure de potassium. Un rapport de 5 ml de solution de KCl par gramme d'équivalent poids sec de sol est recommandé. Afin d'optimiser l'extraction, les récipients contenant le sol et la solution d'extraction ne doivent pas être remplis à plus de la moitié de leur contenance. Les mélanges sont agités à 150 tpm pendant 60 minutes. Les mélanges sont centrifugés ou filtrés et les phases liquides sont analysées pour mesurer le nitrate. Les extraits liquides débarrassés de particules peuvent être stockés à moins 20±5 °C pendant une durée pouvant aller jusqu'à six mois avant d'être analysés.

2 DONNEES

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque échantillon de sol doit être enregistrée, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les taux de transformation de l'azote doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les quantités de nitrate formé sont exprimées en mg nitrate/kg poids sec /jour. On compare le taux de formation de nitrate dans chaque échantillon traité avec le taux dans le témoin, et on calcule l'écart en pourcentage par rapport au témoin.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque réplicat est déterminée, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x . Les quantités de nitrate (mg nitrate/kg poids sec de sol) trouvées dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparées aux quantités observées dans les échantillons témoins. A partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x . Les seuils de confiance ($p = 0.95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standards (10)(11)(12).

Les substances d'essai qui contiennent d'importantes quantités d'azote peuvent être à l'origine des quantités de nitrate qui se forment pendant l'essai. Si ces substances sont testées à une concentration élevée (par exemple, dans le cas des substances chimiques destinées à être utilisées en applications répétées), des contrôles appropriés doivent être prévus dans l'essai (sol plus substance d'essai mais sans farine végétale). Les résultats de ces contrôles doivent être pris en compte dans le calcul des valeurs CE_x .

2.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de formation de nitrate entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et le témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation de l'azote dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10} .

3 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Identification complète du sol utilisé à savoir :

- coordonnées géographiques du site (latitude, longitude);
- information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.);
- type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.);
- profondeur du prélèvement (cm);
- teneur en sable/limon/argile (% poids sec);
- valeurs du pH (dans l'eau);
- teneur en carbone organique (% poids sec);
- teneur en azote (% poids sec);
- concentration initiale en nitrate (mg nitrate/kg poids sec);
- capacité d'échange cationique (mmol/kg);
- biomasse microbienne en pourcentage du carbone organique total;
- référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre;
- toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol;
- détails de la pré-incubation du sol s'il y a lieu.

Substance d'essai :

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques;
- données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, comprenant la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Substrat :

- source du substrat;
- composition (farine de luzerne, farine de luzerne verte);
- teneur en carbone, azote (% poids sec);
- taille du tamis (mm).

Conditions de l'essai :

- détails de la modification du sol avec un substrat organique;
- nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées;
- procédure d'application de la substance d'essai au sol;
- température d'incubation;
- teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai;
- méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels);
- nombre de réplicats;

- temps de prélèvement;
- méthode utilisée pour l'extraction du nitrate du sol;

Résultats :

- procédure analytique et matériel utilisé pour analyser le nitrate;
- tableaux indiquant les valeurs individuelles et moyennes des mesures du nitrate;
- variation entre répliqués dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins;
- explications des corrections apportées aux calculs, le cas échéant;
- la variation en pourcentage des taux de formation de nitrate à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 pour cent, les autres valeurs CE_x (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse;
- traitement statistique des résultats;
- toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4 REFERENCES

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7 : Soil Microflora. EPPO Bulletin 24 : 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4 : Soil Quality - Biological Methods.
- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 janvier 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1 : Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2 : Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.22. MICRO-ORGANISMES DU SOL : ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE

1. METHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 217 (2000) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation du carbone par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (3) et de la SETAC (4), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (5), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (6) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate.

Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation du carbone est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués : l'essai de transformation du carbone et l'essai de transformation de l'azote. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification (nitrapyrine) commerciaux, un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation du carbone à la surface aérobie des sols. L'essai est sensible aux changements de taille et d'activité des colonies microbiennes responsables de la transformation du carbone puisqu'il soumet ces colonies à la

fois au stress chimique et à la carence en carbone. Un sol sableux pauvre en matière organique est utilisé. Ce sol est traité avec la substance d'essai et il est incubé dans des conditions permettant un métabolisme microbien rapide. Dans ces conditions, les sources de carbone présentes dans le sol sont rapidement épuisées. Cela provoque la carence en carbone qui tue à la fois les cellules microbiennes et qui induit la dormance et/ou la sporulation. Si la durée de l'essai est supérieure à 28 jours, on peut mesurer la somme de ces réactions dans les témoins (sol non traité) en mesurant la perte progressive de biomasse microbienne active métaboliquement (7). Si la biomasse d'un sol carencé en carbone, dans les conditions de l'essai, est affectée par la présence d'une substance chimique, celle-ci peut ne pas retrouver le même niveau que l'échantillon témoin. C'est pourquoi la perturbation provoquée par la substance d'essai à n'importe quel moment de l'essai perdurera souvent jusqu'à la fin de l'essai.

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus principalement pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées. En modifiant à la fois la quantité de substance d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on peut également utiliser l'essai pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité susceptible d'atteindre le sol. C'est pourquoi, dans le cas des produits non-agrochimiques, les effets d'une série de concentrations sur la transformation du carbone sont déterminés. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_x , où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2 DEFINITIONS

Transformation du carbone : dégradation par des micro-organismes de la matière organique en son produit final, le dioxyde de carbone inorganique.

CE_x (concentration produisant x % d'effet) : concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x pour cent d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet) : concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 pour cent d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

1.3 SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4 PRINCIPE DE LA METHODE

Le sol tamisé est traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, les échantillons de sol traité et les échantillons témoins sont mélangés avec du glucose, et les taux de respiration induits par le glucose sont mesurés pendant 12 heures consécutives. Les taux de respiration sont exprimés en dioxyde de carbone dégagé (mg dioxyde de carbone/kg sol sec/h) ou oxygène consommé (mg oxygène/kg sol/h). On compare le taux moyen de respiration dans les échantillons de sol traité avec celui des échantillons témoins et on calcule l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin. Tous les essais ont une durée de 28 jours au moins. Si, au 28^{ème} jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures se poursuivent à intervalles de 14 jours pendant une durée maximale de 100 jours. Si l'essai porte sur des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, une série de concentrations de la substance d'essai est ajoutée aux échantillons de sol, et les taux de respiration induits par le glucose (moyenne des quantités de dioxyde de carbone formé ou l'oxygène consommé) sont mesurés au bout de 28 jours. Les résultats des essais effectués avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5 VALIDITE DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé dans (ou par) les échantillons témoins et les échantillons de sol traité, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

1.6 DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1 Appareillage

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire : incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le paragraphe 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échange gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Pour déterminer la respiration induite par le glucose, des systèmes d'incubation et des instruments de mesure de la production de dioxyde de carbone ou de la consommation d'oxygène sont nécessaires. On trouve des exemples de ces systèmes et de ces instruments dans la littérature (8) (9) (10) (11).

1.6.2 Sélection et nombre de sols

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes :

- teneur en sable : supérieure à 50 % et inférieure à 75 %;
- pH : 5.5 - 7.5;
- teneur en carbone organique : 0,5 - 1,5 %;
- la biomasse microbienne doit être mesurée (12)(13) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques correspond aux conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

1.6.3 Prélèvement et stockage des échantillons de sol

1.6.3.1 Prélèvement

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement avec des produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant les prélèvements. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture, et les échantillons de sol ne doivent être prélevés qu'au moins trois mois après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais aux effets biologiques connus (cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâturage) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple). Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2 Stockage

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois à moins 18 °C. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le paragraphe 1.6.2).

1.6.4 Manipulation et traitement du sol pour l'essai

1.6.4.1 Pré-incubation

Si le sol a été stocké (voir les paragraphes 1.6.4.2 et 1.7.1.3), il est recommandé de procéder à une pré-incubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la pré-incubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les paragraphes 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

1.6.4.2 Propriétés physico-chimiques

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.5 Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie : 0,1-0,5 mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme) car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6 Concentrations d'essai

Si l'essai porte sur des produits phytosanitaires ou sur d'autres substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévues. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'application unique.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x .

1.7 EXECUTION DE L'ESSAI

1.7.1 Conditions expérimentales

1.7.1.1 Traitement et contrôle

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées avec l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois répliqués de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois répliqués de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage du sol.

1.7.1.2 Incubation des échantillons de sol

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons : sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de réplicats utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les réplicats et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires de sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le paragraphe 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3 Conditions et durée de l'essai

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le paragraphe 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si celles-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours, si celle-ci est la plus courte. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

1.7.2 Prélèvement et analyse des sols

1.7.2.1 Echelonnement des prélèvements

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure des taux de respiration induits par le glucose aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer la respiration induite par le glucose au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin d'estimer les quantités initiales de biomasse microbienne métaboliquement active dans le sol (12).

1.7.2.2 Mesure des taux de respiration induits par le glucose

Le taux de respiration induit par le glucose est déterminé dans chaque échantillon de sol traité et dans chaque témoin à chaque temps de prélèvement. Les échantillons de sol sont mélangés avec une quantité de glucose suffisante pour entraîner une réaction respiratoire maximale immédiate. La quantité de glucose nécessaire pour provoquer une réaction respiratoire maximale dans un sol donné peut être déterminée dans un essai préliminaire à l'aide d'une série de concentrations de glucose (14). Toutefois, dans le cas des sols sableux contenant 0,5-1,5 % de carbone organique, 2000 mg à 4000 mg de glucose par kg de poids sec sont généralement suffisants. Le glucose peut être réduit en poudre avec du sable de quartz propre (10 g sable/kg poids sec) et mélangé de façon homogène avec le sol.

Les échantillons de sol amendés avec le glucose sont incubés dans un appareil adapté pour mesurer les taux de respiration en continu, toutes les heures, ou toutes les deux heures (voir section 1.6.1) à 20 ± 2 °C. Le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé est mesuré pendant 12 heures consécutives et les mesures doivent commencer le plus rapidement possible, c'est-à-dire 1 à 2 heures après l'adjonction de glucose. On mesure la quantité totale de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé pendant les 12 heures et on détermine le taux moyen de respiration.

2 DONNEES

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé par chaque réplicat doit être enregistré, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les résultats doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les taux de respiration induits par le glucose sont exprimés en mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h. Le taux moyen de formation de dioxyde de carbone ou le taux moyen de consommation d'oxygène de chaque échantillon traité est comparé à celui du témoin, et l'écart en pourcentage par rapport au témoin est calculé.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans chaque réplicat sont déterminées, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x . Les taux de respiration induits par le glucose (mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h) observés dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparés à ceux des échantillons témoins. A partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x . Les seuils de confiance ($p = 0.95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standards (15)(16)(17).

2.2 INTERPRETATION DES RESULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de respiration entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et l'échantillon témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation du carbone dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50} , CE_{25} et/ou CE_{10} .

3 RAPPORT D'ESSAI

RAPPORT DE L'ESSAI

Le rapport de l'essai doit comporter les informations suivantes :

Identification complète du sol utilisé, à savoir :

- coordonnées géographiques du site (latitude, longitude);
- information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.);
- type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.);
- profondeur du prélèvement (cm);
- teneur en sable/limon/argile (% poids sec);
- pH (dans l'eau);
- teneur en carbone organique (% poids sec);
- teneur en azote (% poids sec);
- capacité d'échange cationique (mmol/kg);
- biomasse microbienne initiale en pourcentage du carbone organique total;
- référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre;
- toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol;
- détails de la pré-incubation du sol s'il y a lieu.

Substance d'essai :

- nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques;
- données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, notamment la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Conditions de l'essai :

- détails de la modification du sol avec un substrat organique;
- nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées;
- procédure d'application de la substance d'essai au sol;
- température d'incubation;
- teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai;
- méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels);
- nombre de réplicats;
- temps de prélèvement.

Résultats :

- méthode et matériel utilisés pour mesurer les taux de respiration;
- tableaux indiquant les valeurs individuelles et les valeurs moyennes des quantités de dioxyde de carbone ou d'oxygène;
- variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins;
- explications des corrections apportées aux calculs, s'il y a lieu;
- la variation en pourcentage des taux de respiration induits par le glucose à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 pour cent, les autres valeurs CE_x (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu;
- toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4 REFERENCES

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7 : Soil Microflora. EPPO Bulletin 24 : 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3 : 45-60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis - Part 2 : Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41 : 831- 871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality - Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil : Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A., and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116 : 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1 : Substrate-induced respiration method.

- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2 : Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38 : 113-120.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.23. TRANSFORMATION AEROBIE ET ANAEROBIE DANS LE SOL

1. METHODE

La présente méthode d'essai reprend la méthode TG 307 (2002) de l'OCDE

1.1 INTRODUCTION

La présente méthode d'essai s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode décrite ici est conçue pour mesurer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques dans le sol. Les expériences ont pour but de déterminer (i) le taux de transformation de la substance d'essai, et (ii) la nature des produits de transformation auxquels les végétaux et les organismes du sol peuvent être exposés, ainsi que les taux de formation et de déplétion de ces produits. Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont appliquées directement sur le sol ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement du sol. Les résultats de ces études de laboratoire peuvent également être utilisés pour mettre au point des protocoles d'échantillonnage et d'analyse destinés à des études dans des domaines voisins.

Il est généralement suffisant d'effectuer des études aérobies et anaérobies avec un seul type de sol pour déterminer les voies de transformation (8) (10) (11). Les taux de transformation doivent être déterminés dans trois autres sols au moins (8) (10).

Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, organisé à Belgirate, en Italie en 1995 (10) a défini, notamment, le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai. Les types de sol testés doivent être représentatifs des conditions environnementales d'utilisation ou de rejet prévus. Par exemple, les substances chimiques devant être appliquées sous des climats subtropicaux ou tropicaux doivent être testées avec des Ferrasols ou des Nitosols (système FAO). Cet atelier a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol, sur la base des lignes directrices de l'ISO (15). L'utilisation de sols de rizières est également étudiée dans le cadre de cette méthode.

1.2 DEFINITIONS

Substance d'essai : toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation : toute substance résultant de réactions de transformations biotiques ou abiotiques de la substance d'essai et en particulier le CO₂ et les produits qui se trouvent dans les résidus liés.

Résidus liés : les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous forme de la substance mère ou de ses métabolite(s)/produits de transformation. La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par des méthodes d'extraction qui modifient la matrice et par des techniques analytiques complexes. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente, ionique et de la liaison par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (12) [modifié d'après l'UICPA 1984 (13)].

Transformation aérobie : réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (14).

Transformation anaérobie : réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (14).

Sol : mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote, et à poids moléculaire élevé, contenant de petits (principalement micro) organismes. Le sol peut être manipulé sous deux formes :

(a) non brassé, tel qu'il s'est formé au cours du temps, en couches caractéristiques d'un grand nombre de types de sol;

(b) brassé, tel qu'on le trouve habituellement dans les terres arables ou qu'il est recueilli en creusant et tel qu'il est utilisé dans la présente méthode d'essai (14).

Minéralisation : dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé marqué au ¹⁴C, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de ¹⁴CO₂ (14).

Demi-vie : t_{0,5}, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; la demi-vie est indépendante de la concentration.

DT₅₀ (temps de dégradation 50) : période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 50 %; elle est différente de la demi-vie t_{0,5} lorsque la transformation ne suit pas une cinétique du premier ordre.

DT₇₅ (temps de dégradation 75) : période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT₉₀ (temps de dégradation 90) : période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3 SUBSTANCES DE REFERENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4 APPLICABILITE DE L'ESSAI

La méthode s'applique à toutes les substances chimiques (non marquées ou radiomarquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique présentant une précision et une sensibilité suffisantes. Elle peut être appliquée aux composés légèrement volatils, non-volatils, solubles ou insolubles dans l'eau. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles à partir du sol (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être maintenues dans le sol dans les conditions expérimentales de cet essai.

1.5 INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique. Le marquage au ^{14}C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le marquage doit être situé dans la(les) partie(s) la(les) plus stable(s) de la molécule¹. La pureté de la substance d'essai doit être d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai :

- (a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6)
- (b) solubilité dans les solvants organiques;
- (c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;
- (d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);
- (e) stabilité chimique dans le noir (hydrolyse) (Méthode C.7);
- (f) coefficient pKa si une molécule est susceptible de subir une protonation ou une déprotonation [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (16).

Il peut également être utile de disposer d'informations relatives à la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes du sol [Méthodes d'essai C.21 et C.22] (16).

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation.

1.6 PRINCIPE DE LA METHODE

Les échantillons de sol sont traités avec la substance d'essai et incubés dans le noir dans des flacons de type biomètres ou dans des systèmes à circulation continue dans des conditions de laboratoire contrôlées (à température et humidité constantes). Après un intervalle de temps approprié, les échantillons de sol sont extraits et analysés pour mesurer la substance mère et les produits de transformation. Les produits volatils sont aussi collectés pour analyse au moyen de dispositifs d'absorption appropriés. A l'aide de produit marqué au ^{14}C , il est possible de mesurer les différents taux de minéralisation de la substance d'essai en piégeant le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé et un bilan massique, notamment la formation de résidus liés au sol, peut être établi.

1.7 CRITERES DE QUALITE

1.7.1 Récupération

L'extraction et l'analyse, en double exemplaire au moins, des échantillons de sol immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération concernant les étapes ultérieures des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs. Ces taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (8) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées (3).

1.7.2 Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait de sol, incubé suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

Le seuil de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et des produits de transformation doit être au moins égal à $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ de sol (substance d'essai) ou 1 % de la dose appliquée si celle-ci est inférieure. Le seuil de quantification doit également être spécifié.

1.7.3 Précision des données de transformation

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, des valeurs DT_{75} et DT_{90} .

1.8 DESCRIPTION DE LA METHODE

1.8.1 Appareils et réactifs chimiques

Les incubateurs sont composés de circuits fermés statiques ou de systèmes à circulation continue adaptés (7) (17). Les figures 1 et 2, respectivement, présentent des exemples d'incubateur à circulation continue et de flacons de type biomètre. Les deux types d'incubateur présentent des avantages et des inconvénients (7) (17).

Matériel courant de laboratoire, notamment :

- Instruments d'analyse : chromatographie gaz-liquide, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, y compris les systèmes de détection appropriés pour analyser les substances radiomarquées ou non-marquées ou la méthode de dilution isotopique inverse;
- Instruments destinés à l'identification (spectromètre de masse, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, HPLC-MS, RMN, etc.);
- Compteur à scintillation liquide;
- Appareillage d'oxydation pour la combustion des produits radioactifs;
- Centrifugeuse;
- Appareil d'extraction (par exemple, tubes de centrifugation pour extraction à froid et appareil pour extraction en continu sous reflux de type soxhlet);
- Instrumentation pour concentrer les solutions et les extraits (évaporateur rotatif);
- Bain-marie;
- Mélangeurs mécaniques (pétrin, mélangeur rotatif).

Les réactifs chimiques utilisés sont, par exemple :

- NaOH, de pureté analytique, $2 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$, ou une autre base appropriée (par exemple, KOH, éthanolamine);
- H_2SO_4 , de pureté analytique, $0,05 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$;
- Ethylène glycol, de pureté analytique;
- Matériaux d'absorption solide tels que chaux sodée et tampons de polyuréthane;
- Solvants organiques, de pureté analytique, tels qu'acétone, méthanol, etc.;
- Liquide de scintillation.

1.8.2 Application de la substance d'essai

Pour l'incorporer et la répartir dans le sol, on peut dissoudre la substance d'essai dans l'eau (désionisée ou distillée) ou, si nécessaire, dans une quantité minimale d'acétone ou d'autres solvants organiques (6) dans lesquels la substance d'essai est suffisamment soluble et stable. Toutefois, la quantité de solvant sélectionnée ne doit pas avoir une influence significative sur l'activité microbienne du sol (voir les paragraphes 1.5 et 1.9.2-1.9.3). Il convient d'éviter d'utiliser des solvants qui inhibent l'activité microbienne, comme le chloroforme, le dichlorométhane et autres solvants halogénés.

La substance d'essai peut également être ajoutée sous forme solide, mélangée avec du sable de quartz (6) ou dans un petit sous-échantillon de sol séché à l'air et stérilisé. Si la substance d'essai est ajoutée à l'aide d'un solvant, le solvant doit pouvoir s'évaporer avant que le sous-échantillon chargé soit ajouté à l'échantillon original de sol non-stérile.

Pour les substances chimiques courantes, dont la principale voie de pénétration dans le sol passe par les boues d'épuration ou le traitement agricole, il convient de commencer par ajouter la substance d'essai dans la boue avant de l'introduire dans l'échantillon de sol. (voir les paragraphes 1.9.2 et 1.9.3)

Il n'est pas recommandé d'utiliser systématiquement des produits formulés. Toutefois, pour les substances peu solubles, l'utilisation de produit formulé peut être une solution appropriée.

1.8.3 Sols

1.8.3.1 Sélection du sol

Pour déterminer la voie de transformation, on peut utiliser un sol représentatif; un limon sableux, un limon fin, un limon ou un sable limoneux [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)] avec un pH de 5,5-8,0, une teneur en carbone organique de 0,5-2,5 % et une biomasse microbienne d'au moins 1 % de carbone organique total est recommandée (10).

Pour les études des taux de transformation, il convient d'utiliser au moins trois sols supplémentaires représentatifs de la gamme de sols concernés. La teneur en carbone organique, le pH, la teneur en argile et la biomasse microbienne des sols doivent varier (10).

Pour tous les sols, il convient d'établir au moins les caractéristiques suivantes : texture (% sable, % limon, % argile) [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)], pH, capacité d'échange cationique, carbone organique, densité apparente, caractéristiques de rétention d'eau² et biomasse microbienne (pour les études aérobies uniquement). Des informations complémentaires sur les propriétés du sol peuvent être utiles pour interpréter les résultats. Les méthodes recommandées dans les références (19) (20) (21) (22) (23) peuvent être utilisées pour déterminer les caractéristiques du sol. La biomasse microbienne doit être déterminée à l'aide de la méthode de respiration induite par le substrat (SIR) (25) (26) ou d'autres méthodes (20).

1.8.3.2 Prélèvement, manipulation et stockage des sols

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement, qui englobent la localisation, le couvert végétal, les traitements aux substances chimiques, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou d'autres contaminations. Si les sols ont été traités avec la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes, ils ne doivent pas être utilisés pour les études de transformation (10) (15).

Le sol doit être fraîchement extrait du site (de l'horizon A ou de la couche supérieure de 20 cm) avec une teneur en eau facilitant le tamisage. Pour les sols autres que les sols de rizières, il faut éviter de prélever les échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (> 30 jours) de sécheresse, de gel ou d'inondations (14). Les échantillons doivent être transportés de façon à minimiser les modifications de la teneur en eau du sol et conservés dans le noir avec libre circulation d'air, dans la mesure du possible. Un sac en polyéthylène à fermeture non étanche est généralement indiqué à cet effet.

Le sol doit être traité le plus rapidement possible après le prélèvement. Il convient de retirer les gros débris végétaux, animaux et les pierres avant de passer le sol à travers un tamis de 2 mm pour retirer les petits débris de pierres, et les débris animaux et végétaux. Il convient d'éviter de sécher et de broyer le sol de manière importante avant de le tamiser (15).

Lorsqu'il est difficile de prélever des échantillons en hiver (sol gelé ou recouvert d'une couche de neige), ceux-ci peuvent être prélevés sur un lot de sol stocké dans une serre sous couvert végétal (herbe ou mélange d'herbe et de trèfle). Il est nettement préférable d'effectuer des études avec des sols qui viennent d'être extraits du site, mais si le sol prélevé et traité doit être stocké avant le début de l'étude, les conditions de stockage doivent être appropriées et leur durée doit être limitée (4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois) afin de préserver l'activité microbienne⁽³⁾.

On trouvera des instructions détaillées sur le prélèvement, la manipulation et le stockage des sols à utiliser pour les expériences de biotransformation sous les références (8) (10) (15) (26) (27).

Avant son utilisation dans le cadre du présent essai, le sol traité doit être préincubé afin de permettre la germination et l'élimination des semences, et de rétablir l'équilibre du métabolisme microbien après le passage des conditions de prélèvement ou de stockage aux conditions d'incubation. Une période de pré-incubation de 2 à 28 jours approchant les conditions de température et d'humidité de l'essai réel est généralement indiquée (15). La durée du stockage et de la préincubation ne doit pas dépasser trois mois au total.

1.9 EXECUTION DE L'ESSAI

1.9.1 Conditions de l'essai

1.9.1.1 Température de l'essai

Au cours de toute la période d'essai, les sols doivent être incubés dans le noir, à température constante, respectant les conditions climatiques dans lesquelles l'utilisation ou le rejet interviendra. Une température de 20 ± 2 °C est recommandée pour toutes les substances d'essai susceptibles d'entrer en contact avec le sol dans les climats tempérés. La température doit être enregistrée.

Pour les substances chimiques appliquées ou libérées dans les climats froids (par exemple dans les pays nordiques, pendant l'automne/hiver), des échantillons de sol supplémentaires doivent également être incubés mais à une température plus basse (par exemple à 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 Teneur en humidité

Pour les essais de transformation en milieu aérobie, la teneur en humidité du sol⁴ doit être ajustée et maintenue à une pF située entre 2,0 et 2,5 (3). La teneur en humidité du sol est exprimée en masse d'eau par masse de sol sec et elle doit être contrôlée régulièrement (toutes les 2 semaines par exemple) en pesant les flacons d'incubation et les pertes en eau doivent être compensées par l'adjonction d'eau (de préférence de l'eau du robinet stérilisée par filtration). Il convient de veiller à éviter ou à réduire les pertes de substance d'essai et/ou des produits de transformation par évaporation et/ou photodégradation (le cas échéant) pendant l'ajout d'eau.

Pour les essais de transformation dans des conditions anaérobies et de rizière, le sol est saturé en eau par submersion.

1.9.1.3 Conditions d'incubation aérobies

Dans les systèmes à circulation continue, les conditions aérobies sont maintenues par lessivage périodique ou par aération continue avec de l'air humidifié. Dans les flacons de type biomètre, l'échange d'air est maintenu par diffusion.

1.9.1.4 Conditions aérobies stériles

Pour obtenir des informations sur l'importance de la transformation abiotique d'une substance d'essai, les échantillons de sol peuvent être stérilisés (pour les méthodes de stérilisation, voir les références 16 et 29), traités avec une substance d'essai stérile (par exemple, l'addition de solution à travers un filtre stérile) et aérés avec de l'air stérile humidifié comme décrit au paragraphe 1.9.1.3. Pour les sols de rizière, le sol et l'eau doivent être stérilisés et l'incubation doit être effectuée comme décrit au paragraphe 1.9.1.6.

1.9.1.5 Conditions d'incubation anaérobies

Afin de créer et de maintenir des conditions anaérobies, le sol traité avec la substance d'essai et incubé dans des conditions aérobies pendant 30 jours ou une demi-vie ou DT_{50} (si celle-ci est plus courte) est ensuite recouvert d'eau (couche de 1-3 cm d'eau) et le système d'incubation est balayé avec un gaz inerte (azote ou argon)⁽⁵⁾. Le système d'essai doit permettre de mesurer le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox et comprendre des dispositifs de piégeage des produits volatils. Le système de type biomètre doit être fermé pour éviter toute entrée d'air par diffusion.

1.9.1.6 Conditions d'incubation dans les sols de rizière

Pour étudier la transformation dans les sols de rizière, le sol est recouvert d'une couche d'eau de 1-5 cm environ et la substance d'essai appliquée à la phase aqueuse (9). Une profondeur de couche de sol de 5 cm au moins est recommandée. Le système est ventilé avec de l'air comme en situation aérobie. Le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox de la couche aqueuse doivent être surveillés et enregistrés. Une période de pré-incubation de deux semaines au moins est nécessaire avant de commencer les études de transformation (voir le paragraphe 1.8.3.2).

1.9.1.7 Durée de l'essai

En règle générale, les études des taux et des voies de transformation ne doivent pas dépasser 120 jours⁶ (3) (6) (8), parce qu'au-delà, dans un système artificiel en laboratoire qui ne peut se reconstituer naturellement, on peut attendre une diminution de l'activité microbienne du sol avec le temps. S'il est nécessaire de caractériser la déplétion de la substance d'essai et la formation et la déplétion des principaux produits de transformation, les études peuvent être poursuivies pendant une période plus longue (de 6 à 12 mois) (8). Des périodes d'incubation plus longues doivent être justifiées dans le rapport d'essai et accompagnées de mesures de la biomasse pendant et à la fin de ces périodes.

1.9.2 Exécution de l'essai

On place 50 à 200 g de sol environ (sur la base du poids sec) dans chaque flacon d'incubation (voir les figures 1 et 2 à l'annexe 3) et on traite le sol avec la substance d'essai en utilisant l'une des méthodes décrites au paragraphe 1.8.2. Si l'on utilise des solvants organiques pour appliquer la substance d'essai, il convient de les éliminer du sol par évaporation. Puis, le sol est soigneusement mélangé à l'aide d'une spatule et/ou en agitant le flacon. Si l'étude est menée dans des conditions de sol de rizière, le sol et l'eau doivent être soigneusement mélangés après l'application de la substance d'essai. De petits aliquots (1 g par exemple) des sols traités doivent être analysés pour mesurer la substance d'essai afin de vérifier l'uniformité de la répartition. D'autres méthodes sont décrites ci-dessous.

Le taux de traitement doit correspondre à la dose d'application la plus élevée d'un produit phytosanitaire recommandée dans les instructions d'utilisation et à l'incorporation uniforme à une profondeur appropriée dans le champ (couche supérieure du sol sur 10 cm⁷). Par exemple, pour les substances chimiques appliquées sur le feuillage ou sans enfouissement dans le sol, la profondeur appropriée pour calculer la quantité de substance chimique à ajouter à chaque flacon est de 2,5 cm. Pour les substances chimiques enfouies dans le sol, la profondeur appropriée est la profondeur d'enfouissement spécifiée dans les instructions d'utilisation. Pour les substances chimiques courantes, la dose d'application doit être estimée sur la base de la voie de pénétration la plus pertinente; par exemple, lorsque les boues d'épuration sont la principale voie de pénétration dans le sol, la substance chimique doit être dosée dans la boue à une concentration correspondant à la concentration prévue et la quantité de boue ajoutée au sol doit correspondre à la charge normale en boue des sols agricoles. Si cette concentration n'est pas suffisamment élevée pour identifier les principaux produits de transformation, l'incubation d'échantillons de sol contenant des taux plus élevés peut être utile, mais il convient d'éviter des taux excessifs qui influencent les fonctions microbiennes du sol (voir les paragraphes 1.5 et 1.8.2).

Un autre moyen consiste à traiter un lot plus important (de 1 à 2 kg) de sol avec la substance d'essai, en le mélangeant soigneusement dans un mélangeur adapté puis en le transférant en petites fractions de 50 à 200 g dans les flacons d'incubation (par exemple à l'aide de répartiteurs). De petits aliquots (1 g par exemple) du lot de sol traité doivent être analysés afin de vérifier l'uniformité de la répartition de la substance d'essai. Cette procédure est préférable car elle permet une répartition plus uniforme de la substance d'essai dans le sol.

De même, les échantillons de sol non traités sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse pendant le déroulement et à la fin des essais.

Lorsque la substance d'essai est appliquée dans le sol dissous dans un (ou plusieurs) solvant(s) organique(s), des échantillons de sol traité avec la même quantité de solvant(s) sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse au début, pendant le déroulement et à la fin des essais afin de contrôler les effets du(des) solvant(s) sur la biomasse microbienne.

Les flacons contenant le sol traité sont attachés au système à circulation continue décrit à la Figure 1 ou fermés par la colonne d'absorption présentée dans la Figure 2 (voir l'Annexe 3).

1.9.3 Echantillonnage et mesures

Les flacons d'incubation en deux exemplaires sont retirés à des intervalles appropriés et les échantillons de sol extraits à l'aide de solvants appropriés de polarité différente et analysés pour mesurer la substance d'essai et/ou les produits de transformation. Une étude bien conçue comprend un nombre suffisant de flacons de façon à pouvoir sacrifier deux flacons à chaque prélèvement. De plus, des solutions d'absorption ou des matériaux d'absorption solides sont retirés à différents intervalles de temps (tous les 7 jours au cours du premier mois et, au bout d'un mois, tous les 17 jours) pendant et à la fin de l'incubation de chaque échantillon de sol et analysés pour mesurer les produits volatils. Par ailleurs, au moins 5 points supplémentaires de prélèvement devraient être prévus en plus de l'échantillon de sol prélevé directement après application (échantillon de 0 jour). Les intervalles de temps doivent être choisis de façon à pouvoir établir la courbe de déplétion de la substance d'essai et les courbes de formation et de déplétion des produits de transformation (par exemple 0, 1, 3, 7 jours; 2, 3 semaines; 1, 2, 3 mois, etc.).

Lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C , la radioactivité non extractible est quantifiée par combustion et un bilan massique est calculé pour chaque intervalle de prélèvement.

Dans le cas de l'incubation anaérobie et des sols de rizière, la phase sol et la phase aqueuse peuvent être analysées ensemble pour mesurer la substance d'essai et les produits de transformation ou séparées par filtration ou centrifugation avant extraction et analyse.

1.9.4 Essais facultatifs

Il peut être utile d'effectuer des études aérobies non stériles à d'autres températures et humidités de sol pour estimer l'influence de la température et de l'humidité du sol sur le taux de transformation d'une substance d'essai et/ou de ses produits de transformation dans le sol.

On peut essayer d'effectuer une caractérisation plus poussée de la radioactivité non extractible en utilisant, par exemple, l'extraction par un fluide supercritique.

2 DONNEES

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Les quantités de substance d'essai, de produits de transformation, de substances volatiles (en % uniquement), et non extractibles doivent être données en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $\text{mg}\times\text{kg}^{-1}$ de sol (sur la base du poids sec de sol) à chaque intervalle de prélèvement. Pour chaque intervalle de prélèvement, un bilan massique doit être donné en pourcentage de la concentration initiale appliquée. La représentation graphique des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'estimer sa durée de demi-vie de la transformation ou sa DT_{50} . Les produits de transformation principaux doivent être identifiés et leurs concentrations doivent également être présentées graphiquement en fonction du temps afin de montrer leurs taux de formation et de déplétion. On entend par produit de transformation principal tout produit représentant $\geq 10\%$ de la dose appliquée à n'importe quel moment de l'étude.

Les produits volatils piégés donnent une indication du potentiel de volatilité d'une substance d'essai et de ses produits de transformation à partir du sol.

Il est possible de déterminer avec plus de précision les demi-vies ou les valeurs DT_{50} et, s'il y a lieu, les valeurs DT_{75} et DT_{90} en utilisant des méthodes de calcul basées sur des modèles cinétiques appropriés. La durée de demi-vie et les valeurs DT_{50} doivent être notées dans le rapport avec la description du modèle cinétique utilisé, l'ordre de la cinétique et le coefficient de détermination (r^2). La cinétique du premier ordre est préférable sauf si $r^2 < 0,7$. Si nécessaire, les calculs doivent aussi être appliqués aux principaux produits de transformation. Des exemples des modèles appropriés sont décrits sous les références 31 à 35.

Dans le cas des études de taux effectuées à des températures différentes, les taux de transformation doivent être décrits comme fonction de la température à l'intérieur de l'intervalle de température de l'expérience en appliquant la formule de la relation d'Arrhenius :

$$k = A \cdot e^{-B/T} \quad \text{or} \quad \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

où $\ln A$ et B sont des constantes de régression, respectivement, l'intersection et la pente de la droite d'interpolation produite par régression linéaire de $\ln k$ par rapport à $1/T$, où k est la constante de vitesse à la température T et T la température en degrés Kelvin. Il convient de prendre soin à l'intervalle limité de température à l'intérieur de laquelle la relation d'Arrhenius est valable dans le cas où la transformation dépend de l'activité microbienne.

2.2 EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Bien que les études soient effectuées dans un système artificiel en laboratoire, les résultats permettent d'estimer le taux de transformation de la substance d'essai ainsi que les taux de formation et de déplétion des produits de transformation dans des conditions de terrain (36) (37).

L'étude des voies de transformation d'une substance d'essai donne des informations sur la façon dont la structure de la substance appliquée est modifiée dans le sol par des réactions chimiques et microbiennes.

3 RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale (indiquant la (les) position(s) du (des) marquage(s) lorsqu'on utilise un produit radiomarké) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir le paragraphe 1.5);
- pureté (impuretés) de la substance d'essai;
- pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (s'il y a lieu);

Substances de référence :

- nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier le produit de transformation;

Sol d'essai :

- détails du site de prélèvement;
- date et procédure d'échantillonnage du sol;
- propriétés des sols : pH, teneur en carbone organique, texture (% sable, % limon, % argile), capacité d'échange cationique, densité apparente, caractéristique de rétention d'eau, et biomasse microbienne;
- durée et conditions de stockage du sol (s'il y a lieu);

Conditions d'essai :

- dates de réalisation des études;
- quantité de substance d'essai appliquée;
- solvants utilisés et méthode d'application de la substance d'essai;
- poids de sol traité initialement et prélevé à chaque intervalle pour analyse;
- description du système d'incubation utilisé;
- débit d'écoulement de l'air (pour les systèmes à circulation continue uniquement);
- température au début de l'expérience;
- teneur en humidité du sol pendant l'incubation;
- biomasse microbienne au début, pendant le déroulement et à la fin des études aérobies;
- pH, concentration en oxygène et potentiel redox au début, pendant le déroulement et à la fin des études anaérobies et des sols de rizière;
- méthode(s) d'extraction;
- méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et des principaux produits de transformation dans le sol et matériau d'absorption;
- nombre de réplicats et nombre de témoins.

Résultats :

- résultat de la détermination de l'activité microbienne;
- reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées;
- taux de récupération (les pourcentages acceptables pour que l'étude soit valable sont présentés au paragraphe 1.7.1);
- tableaux de résultats exprimés en % de la dose initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ de sol (sur la base de poids sec);
- bilan massique pendant et à la fin des études;
- caractérisation de la radioactivité non extractible (liée) ou des résidus dans le sol;
- quantification du CO_2 dégagé et des autres composés volatils;
- graphes représentant la concentration de la substance d'essai dans le sol en fonction du temps et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation;
- demi-vie ou DT_{50} , DT_{75} et DT_{90} pour la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation, ainsi que les limites de confiance;
- estimation de la vitesse de dégradation abiotique dans des conditions stériles;
- évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation;
- voies de transformation proposées, s'il y a lieu;
- discussion et interprétation des résultats;
- données brutes (chromatogramme des échantillons, calcul des vitesses de transformation des échantillons et moyens utilisés pour identifier les produits de transformation).

4 REFERENCES

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry : Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Union européenne (UE) (1995). Directive 95/36/CE de la Commission, du 14 juillet 1995, modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe II, Partie A et Annexe III, Partie A : Devenir et comportement dans l'environnement.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G : Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil - Part 1 : Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF - Japon 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italie, 18-20 janvier 1995.

- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In *Interactions between Herbicides and the Soil* (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) DFG : Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts : Non extractable pesticide residue in soils and plants. *Pure Appl. Chem.* 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) Ligne directrice de l'OCDE 304 A : Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981)
- (15) ISO 10381-6 (1993). Qualité des sols - Echantillonnage - Partie 6 : Guide du prélèvement, de la manipulation et du stockage des sols pour l'évaluation des processus microbiens en laboratoire.
- (16) Annexe V à la directive 67/548/CEE
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems) : *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26 :305 (1962).
- (19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1 : Substrate-induced respiration method. Part 2 : fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment : Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197-200.
- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141-146.
- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. *Proc. BCPC Symposium : Persistence of Insecticides and Herbicides*, 181-199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In *Environmental Dynamics of Pesticides* ». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide résidus. II. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer* 39, 188-204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer* 33, 47-60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. *Environm. Sci. Technol.* 24, 1032-1041.
- (37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In *Interactions between Herbicides and the Soil* (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

Notes

- (¹) Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.
- (²) La caractéristique de rétention d'eau d'un sol peut être mesurée comme capacité au champ, capacité de rétention d'eau ou comme potentiel de succion (pF). Pour les explications, voir l'Annexe 1. Il convient d'indiquer dans le rapport d'essai si les caractéristiques de rétention d'eau et la densité apparente des sols ont été déterminées sur des échantillons de sol non brassé ou avec des échantillons brassés (transformés).
- (³) Des résultats récents indiquent que les sols des zones tempérées peuvent également être stockés à -20°C pendant plus de trois mois (28)(29) sans perte significative de l'activité microbienne.
- (⁴) Le sol ne doit jamais être trop humide ni trop sec afin de maintenir des conditions adéquates d'aération et de nutrition de la microflore du sol. Les teneurs en eau recommandées pour une croissance microbienne optimale vont de 40 à 60 % de capacité de rétention d'eau (WHC) et de 0,1 à 0,33 bar (6). Cette fourchette est équivalente à un intervalle de pF de 2,0 – 2,5. L'Annexe 2 présente la teneur habituelle en eau de plusieurs types de sol.
- (⁵) Les conditions aérobies sont prédominantes dans les sols de surface et même dans les sols sub-surfaciques comme le montre un projet de recherche financé par l'UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils : Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. *Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol.*, 270-277, 17-21 août 1992, Sigtuna, Suède]. Les conditions anaérobies peuvent ne se produire qu'occasionnellement sur des sols inondés après d'importantes chutes de pluie ou sur des sols de rizières submergées.

- (6) Les études aérobies doivent être terminées en moins de 120 jours sous réserve que la voie de transformation et la minéralisation se soient effectivement produites à cette date. Il est possible de mettre fin à l'essai au bout de 120 jours, ou lorsque 90 % au moins de la substance d'essai sont transformés, mais seulement si il y a formation de 5 % de CO₂ au moins.
- (7) Calcul de la concentration initiale en fonction de la superficie à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{sol} [mg/kg_{sol}] = \frac{A [kg/ha] \cdot 10^6 [mg/kg]}{l [m] \cdot 10^4 [m^2/ha] \cdot d [kg_{sol}/m^3]}$$

C_{sol} = concentration initiale dans le sol [mg·kg⁻¹]

A = Taux d'application [kg·ha⁻¹]; l = épaisseur de la couche de sol du champ [m]; d = densité apparente du sol sec [kg·m⁻³].

En règle générale, si on applique un taux de 1 kg·ha⁻¹ on obtient une concentration de 1 mg·kg⁻¹ environ dans une couche de 10 cm (en supposant une densité apparente de 1 g·cm⁻³).

ANNEXE 1

SUCCION, CAPACITE AU CHAMP (FC) ET CAPACITE DE RETENTION D'EAU (WHC)(1)

Hauteur de la colonne d'eau [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Remarques
10 ⁷	7	10 ⁴	Sol sec
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Point de flétrissement
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	
10 ²	2	0,1	} Échelle de la capacité au champ ^(d)
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	} Capacité de rétention d'eau (approximation)
1	0	0,001	

(a) pF = log de la colonne d'eau en cm.

(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

(c) Correspond à une teneur en eau approximative de 10% dans le sable, de 35% dans le limon et de 45% dans l'argile.

(d) La capacité au champ n'est pas constante mais varie selon le type de sol de pF 1,5 à 2,5.

La *succion* est mesurée en cm de colonne d'eau ou en bar. Comme l'échelle de valeur de la succion est très large, celle-ci est exprimée simplement en pF, qui est égal au logarithme de la colonne d'eau en cm.

La *capacité au champ* (FC) est définie comme la quantité d'eau qui peut être stockée contre la gravité par un sol naturel 2 jours après une longue période de pluie ou après une irrigation suffisante. Elle est déterminée dans un sol non brassé in situ dans le champ. Cette mesure ne peut donc pas s'appliquer aux échantillons de sol brassé. Les valeurs de capacité au champ déterminées dans les sols brassés peuvent présenter une variabilité systématique importante.

La *capacité de rétention d'eau* (WHC) est déterminée en laboratoire avec un sol non brassé et un sol brassé en saturant une colonne de sol avec de l'eau par capillarité. Elle est particulièrement utile pour les sols brassés et peut être jusqu'à 30 % supérieure à la capacité au champ (1). Elle est également plus facile à déterminer expérimentalement que des valeurs de capacité au champ fiables.

(1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

ANNEXE 2

TENEUR EN HUMIDITE (g d'eau pour 100 g de sol sec) DE DIFFERENTS TYPES DE SOL PROVENANT DE DIFFERENTS PAYS

Type de sol	Pays	Teneur en humidité à		
		WHC ¹	pF = 1,8	pF = 2,5
Sable	Allemagne	28,7	8,8	3,9
Sable limoneux	Allemagne	50,4	17,9	12,1
Sable limoneux	Suisse	44,0	35,3	9,2
Limon fin	Suisse	72,8	56,6	28,4
Limon argileux	Brésil	69,7	38,4	27,3
Limon argileux	Japon	74,4	57,8	31,4
Limon sableux	Japon	82,4	59,2	36,0
Limon fin	États-Unis	47,2	33,2	18,8
Limon sableux	États-Unis	40,4	25,2	13,3

¹ Capacité de rétention d'eau

ANNEXE 3

Figure 1

Exemple d'appareil à circulation continue pour étudier la transformation des substances chimiques dans le sol (1)(2)

- | | | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1: robinet à pointeau | 4: flacon pour le métabolisme du sol (saturé en eau uniquement pour les conditions anaérobies et de rizière;) | 7, 8: piège d'hydroxyde de sodium pour le CO ₂ & autres acides volatils |
| 2: bouteille de lavage du gaz contenant de l'eau | 5: piège à éthylène glycol pour les composés volatils organiques | 9: débitmètre. |
| 3: ultramembrane (conditions stériles uniquement), taille de pore 0,2 µm | 6: piège à acide sulfurique pour les composés alcalins volatils | |

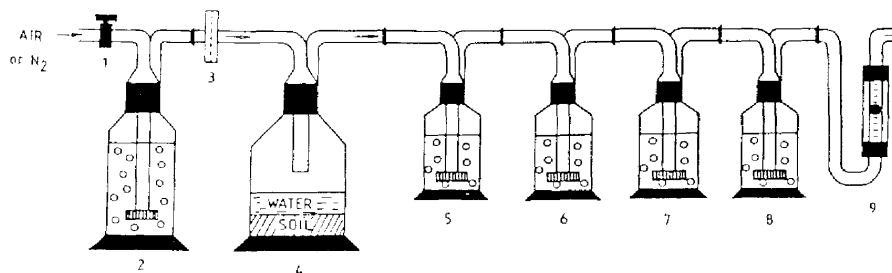
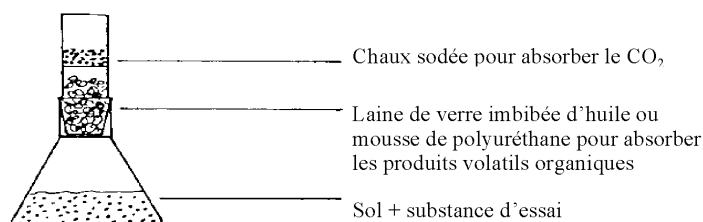


Figure 2

Exemple de flacon de type biomètre pour l'étude de la transformation des substances chimiques dans le sol (3)



- (1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

C.24. TRANSFORMATION AEROBIE ET ANAEROBIE DANS LES SYSTEMES SEDIMENTAIRES AQUATIQUES

1. METHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 308 (2002) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

Les substances chimiques peuvent pénétrer dans les eaux de surface peu ou très profondes par des voies telles que l'application directe, la déperdition lors de l'épandage, le ruissellement, le drainage, l'élimination des déchets, les effluents industriels, domestiques ou agricoles et le dépôt atmosphérique. La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour évaluer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques organiques dans les systèmes sédimentaires aquatiques. Elle s'appuie sur les lignes directrices existantes (1)(2)(3)(4)(5)(6). Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, en Italie en 1995 (7) a défini notamment le nombre et le type de sédiments à utiliser dans le cadre de cet essai. Il a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sédiments, sur la base des lignes directrices de l'ISO (8). Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont introduites directement dans l'eau ou qui sont susceptibles de pénétrer dans le milieu aquatique par les voies décrites ci-avant.

La phase aqueuse supérieure des systèmes sédimentaires aquatiques présente souvent des conditions aérobies. La couche superficielle du sédiment peut être aérobie ou anaérobie, alors qu'en profondeur, le sédiment est généralement anaérobie. Afin de tenir compte de toutes ces possibilités, le présent document décrit des essais aérobies et anaérobies. L'essai aérobie simule une colonne d'eau aérobie sur une couche de sédiment aérobie et une sous-couche avec un gradient anaérobie. L'essai anaérobie simule un système eau-sédiment complètement anaérobie. Si selon les circonstances, il est nécessaire de s'écarter sensiblement de ces recommandations, par exemple en utilisant des carottes de sédiment intact ou des sédiments qui ont pu être exposés à la substance d'essai, il existe d'autres méthodes à cette fin (9).

1.2 DEFINITIONS

Il convient d'utiliser dans tous les cas les unités standard internationales (SI).

Substance d'essai : toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation : toutes les substances résultant des réactions de transformation biotiques et abiotiques de la substance d'essai et notamment le CO₂ et les résidus liés.

Résidus liés : les « résidus liés » désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous la forme de la substance mère ou de ses métabolite(s). La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par les méthodes d'extraction qui modifient la matrice et des techniques analytiques sophistiquées. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente ionique, par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (10) [modifié d'après l'UICPA 1984 (11)].

Transformation aérobie : (oxydation) : réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (12).

Transformation anaérobie : (réduction) : réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (12).

Eaux naturelles : eaux superficielles provenant de mares, rivières, fleuves, etc.

Sédiment : mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote et à masse moléculaire élevée. Il est déposé par les eaux naturelles avec lesquelles il forme une interface.

Minéralisation : dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé radiomarké, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé ou réduit quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de ¹⁴CO₂ ou de ¹⁴CH₄, respectivement.

Demi-vie, t_{0,5} : temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; elle est indépendante de la concentration initiale.

DT₅₀ (temps de dégradation 50) : période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 50 %.

DT₇₅ (temps de dégradation 75) : période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT₉₀ (temps de dégradation 90) : période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3 SUBSTANCES DE REFERENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4 INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation, bien qu'il soit préférable d'utiliser du matériel marqué. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique. Le marquage au ¹⁴C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P, peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le marquage doit être situé dans la partie(s) la plus stable de la molécule¹. La substance d'essai doit avoir une pureté chimique et/ou radiochimique d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai :

- solubilité dans l'eau (méthode A.6);
- solubilité dans les solvants organiques;
- pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;
- coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);
- coefficient d'adsorption (K_d, K_f ou K_{oc}, s'il y a lieu) (Méthode C.18);
- hydrolyse (Méthode C.7);
- constante de dissociation (pK_a) [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (13);
- structure chimique de la substance d'essai et position des marqueurs isotopiques, s'il y a lieu.

Note : Il convient d'indiquer la température à laquelle ces mesures ont été effectuées.

Il peut également être utile de disposer d'informations sur la toxicité de la substance d'essai sur les microorganismes, sur la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque, ainsi que sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol.

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation dans l'eau et dans les sédiments (voir le paragraphe 1.7.2).

1.5 PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode décrite ici emploie un système sédimentaire aquatique aérobie et anaérobie (voir l'Annexe 1) qui permet :

- (i) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans un système eau-sédiment,
- (ii) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment,
- (iii) de mesurer le taux de minéralisation de la substance d'essai et/ou de ses produits de transformation (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C),
- (iv) d'identifier et de quantifier les produits de transformation dans les phases aqueuse et sédimentaire et notamment le bilan massique (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée),
- (v) de mesurer la répartition de la substance d'essai et de ses produits de transformation entre les deux phases pendant une période d'incubation dans le noir (pour éviter par exemple, la prolifération d'algues) à température constante. Les durées de demi-vie, les valeurs DT_{50} , DT_{75} et DT_{90} sont déterminées lorsque les données le permettent, mais elles ne doivent pas être extrapolées bien au-delà de la période expérimentale (voir le paragraphe 1.2).

Au moins deux sédiments et les phases aqueuses associées sont nécessaires pour les études aérobies et anaérobies respectivement (7). Il peut toutefois être nécessaire dans certains cas d'utiliser plus de deux sédiments aquatiques, par exemple, pour une substance chimique pouvant être présente dans l'eau douce et/ou le milieu marin.

1.6 APPLICABILITE DE L'ESSAI

La méthode peut être appliquée aux substances chimiques (marquées ou non marquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique de précision et de sensibilité suffisantes. Elle s'applique à des composés faiblement volatils, non-volatils, hydrosolubles ou peu hydrosolubles. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles dans l'eau (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être gardées dans l'eau et/ou le sédiment dans les conditions expérimentales de cet essai.

La méthode a été appliquée jusqu'ici pour étudier la transformation des substances chimiques dans les eaux douces et dans les sédiments, mais en principe, elle peut également être appliquée aux systèmes estuariens/marins. Elle n'est pas adaptée à la simulation des conditions de l'eau courante (rivières) ou de pleine mer.

1.7 CRITERES DE QUALITE

1.7.1 RECUPERATION

L'extraction et l'analyse, au moins en double exemplaire, des échantillons d'eau et de sédiment immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération des stades ultérieurs des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs (lorsqu'on utilise une substance marquée). Les taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (6) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées.

1.7.2 REPRODUCTIBILITE ET SENSIBILITE DE LA METHODE ANALYTIQUE

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait d'échantillons d'eau ou de sédiments, incubés suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

La limite de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et ses produits de transformation doit être au moins égale à $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dans l'eau ou le sédiment (substance d'essai) ou à 1 % de la quantité initiale appliquée à un système d'essai si cette quantité est inférieure. La limite de quantification doit également être spécifiée.

1.7.3 PRECISION DES DONNEES DE TRANSFORMATION

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations appropriées sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, des valeurs DT_{75} et DT_{90} .

1.8 DESCRIPTION DE LA METHODE

1.8.1 Système et appareillage d'essai

L'étude doit être effectuée dans des récipients en verre (bouteilles, tubes de centrifugation), à moins que les informations préliminaires (coefficient de partage n-octanol/eau, données de sorption, etc.) indiquent que la substance d'essai risque d'adhérer au verre, auquel cas on peut envisager l'utilisation d'un autre matériau (Téflon). Lorsque l'on sait que la substance d'essai adhère au verre, il est possible de contourner le problème en utilisant l'une des méthodes suivantes :

- déterminer la masse de la substance d'essai et de ses produits de transformation sorbés sur le verre;
- veiller à nettoyer toute la verrerie à l'aide d'un solvant à la fin de l'essai;
- utilisation de produits formulés (voir également le paragraphe 1.9.2);
- utilisation d'une quantité croissante de co-solvant pour ajouter la substance d'essai au système; si l'on utilise un co-solvant, celui-ci ne doit pas entraîner de réaction de solvolysse avec la substance d'essai.

Des exemples d'appareillage d'essai courant (systèmes à flux continu et biomètres) sont présentés dans les annexes 2 et 3, respectivement (14). On trouvera d'autres systèmes d'incubation sous la référence 15. L'appareil utilisé pour l'expérience doit permettre l'échange d'air ou d'azote et le piégeage des produits volatils. Les dimensions de l'appareillage doivent permettre de satisfaire aux exigences de l'essai (voir le paragraphe 1.9.1). La ventilation peut être effectuée soit par léger barbotage soit en faisant circuler de l'air ou de l'azote à la surface de l'eau. Dans ce cas, il est conseillé de remuer doucement la surface de l'eau pour obtenir une meilleure répartition de l'oxygène ou de l'azote dans l'eau. Il ne faut pas utiliser d'air sans CO_2 car cela pourrait entraîner une augmentation du pH de l'eau. Dans les deux cas, il n'est pas souhaitable de toucher au sédiment et il convient de l'éviter dans toute la mesure du possible. Les

substances chimiques faiblement volatiles doivent être testées dans un système de type biomètre en remuant légèrement la surface de l'eau. Des récipients fermés avec un espace libre d'air atmosphérique ou d'azote et des fioles à l'intérieur pour le piégeage des produits volatils peuvent également être utilisés (16). Un bon échange du gaz de surface est nécessaire dans l'essai aérobique afin de compenser la consommation d'oxygène par la biomasse.

La liste non restrictive des pièges adaptés à la collecte des produits de transformation volatils est la suivante : solutions à $1 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$ d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium pour le dioxyde de carbone² et éthylène glycol, éthanolamine ou 2 % paraffine dans le xylène pour les composés organiques. Les produits volatils formés en anaérobique, comme le méthane, peuvent être récupérés, par exemple, à l'aide de tamis moléculaires. Ces produits volatils peuvent être brûlés, par exemple, en CO_2 en faisant passer le gaz à travers un tube de quartz rempli de CuO à la température de $900 \text{ }^\circ\text{C}$ et en piégeant le CO_2 formé dans une colonne d'absorption contenant un produit alcalin (17).

Des instruments de laboratoire pour l'analyse chimique de la substance d'essai et des produits de transformation sont nécessaires (chromatographie gaz-liquide (GLC), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince (TLC), spectroscopie de masse (MS), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), résonance magnétique nucléaire (RMN), etc.), ainsi que, le cas échéant, des dispositifs de détection des substances chimiques radiomarquées ou non marquées. Lorsqu'on utilise des substances radiomarquées, un compteur à scintillation liquide et un appareil d'oxydation pour la combustion (pour la combustion des échantillons de sédiment avant l'analyse de radioactivité) sont également nécessaires.

D'autres équipements courants de laboratoire peuvent s'avérer nécessaires selon le cas pour effectuer des analyses physico-chimiques et biologiques (voir le Tableau 1 au paragraphe 1.8.2.2), ainsi que de la verrerie, des produits chimiques et des réactifs.

1.8.2 Sélection et nombre de sédiments aquatiques

Les sites de prélèvement doivent être choisis en fonction de la finalité de l'essai dans une situation donnée. Pour choisir les sites de prélèvement, il convient de prendre en compte l'historique des éventuels apports agricoles, industriels ou domestiques dans le bassin versant et les eaux en amont. Les sédiments ne doivent pas être utilisés s'ils ont été contaminés par la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des 4 années précédentes.

1.8.2.1 Sélection des sédiments

On utilise généralement deux sédiments pour les études aérobiques (7). Les deux sédiments sélectionnés doivent différer en texture et en teneur en carbone organique. Un sédiment doit avoir une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, et l'autre doit avoir une teneur en carbone organique peu élevée (0,5-2,5 %) et une texture grossière. La différence de teneur en carbone organique doit être normalement égale ou supérieure à 2 %. On entend par "texture fine" une teneur en [argile + limon]³ > 50 % et par "texture grossière" une teneur en [argile + limon] < 50 %. La différence de teneur [argile + limon] entre les deux sédiments doit être normalement égale ou supérieure à 20 %. Dans le cas où des substances chimiques risquent d'entrer également en contact avec les eaux de mer, au moins un des deux systèmes eau-sédiment doit être d'origine marine.

Pour l'étude strictement anaérobique, deux échantillons de sédiments (ainsi que la phase aqueuse associée) doivent être prélevés dans les zones anaérobiques des systèmes à eaux de surface (7). Les sédiments comme les phases aqueuses doivent être manipulés et transportés avec précaution en évitant tout contact avec l'oxygène.

D'autres paramètres peuvent présenter de l'importance dans la sélection des sédiments et ils doivent être envisagés au cas par cas. Par exemple, le pH des sédiments est important pour tester les substances chimiques dont la transformation et/ou la sorption peuvent être dépendantes du pH. La dépendance au pH de la sorption peut être une conséquence du pK_a de la substance d'essai.

1.8.2.2 Caractérisation des échantillons eau-sédiment

Les paramètres clés qui doivent être mesurés et notés dans le rapport (en indiquant la méthode utilisée) pour l'eau et pour le sédiment, ainsi que l'étape de l'essai à laquelle ces paramètres doivent être déterminés, sont résumés dans le tableau ci-dessous. Pour information, les méthodes de détermination de ces paramètres sont fournies sous les références (18) (19) (20) (21).

Par ailleurs, il peut être nécessaire de mesurer et d'enregistrer d'autres paramètres selon le cas (eau douce : particules, alcalinité, dureté, conductivité, NO_3/PO_4 (rapport et valeurs individuelles); pour les sédiments : capacité d'échange cationique, capacité de rétention d'eau, carbonate, azote total et phosphore; et pour les systèmes marins : salinité). Il peut également être utile d'analyser les sédiments et l'eau pour mesurer le nitrate, le sulfate, le fer biodisponible, et d'autres accepteurs d'électrons peuvent aussi être utiles pour évaluer les conditions redox, notamment en ce qui concerne la transformation anaérobique.

Paramètres mesurés pour la caractérisation des échantillons d'eau et de sédiment (7) (22) (23)

Paramètre	Etape de la procédure d'essai					
	prélèvement sur site	post-manipulation	début de l'acclimatation	début de l'essai	pendant l'essai	à la fin de l'essai
Eau						
Origine/source	x					
Température	x					
pH	x		x	x	x	x
Carbone organique total			x	x		x
Concentration O ₂ *	x		x	x	x	x
Potentiel redox*			x	x	x	x
Sédiment						
Origine/source	x					
Profondeur de la couche	x					
pH		x	x	x	x	x
Répartition de la taille des particules		x				
Carbone organique total		x	x	x		x
Biomasse microbienne**		x		x		x
Potentiel redox *	Observation (couleur/odeur)		x	x	x	x

* Selon des résultats récents, les mesures des concentrations d'oxygène dans l'eau et des potentiels redox n'ont de valeur ni mécanique ni prédictive en ce qui concerne la croissance et le développement de colonies microbiennes dans les eaux superficielles (24)(25). La détermination de la demande biochimique en oxygène (lors du prélèvement, au début et à la fin de l'essai) et des concentrations de micro/macro éléments nutritifs Ca, Mg et Mn (au début et à la fin de l'essai) dans l'eau et la mesure du N total et du P total dans les sédiments (lors du prélèvement et à la fin de l'essai) peuvent être de meilleurs outils pour interpréter et évaluer les taux et les voies de biotransformation aérobie.

** Méthode du taux de respiration microbienne (26), méthode de fumigation (27) ou mesures de numération (bactéries, actinomycètes, champignons et colonies totales) pour les études aérobies; taux de méthanogenèse pour les études anaérobies.

1.8.3 Prélèvement, manipulation et stockage

1.8.3.1 Prélèvement

Il convient de se référer au projet de ligne directrice ISO sur l'échantillonnage des fonds sédimentaires (8) pour prélever les échantillons de sédiment. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés sur la totalité de la couche supérieure de 5 à 10 cm du sédiment. L'eau correspondante doit être collectée sur le même site ou dans le même lieu et en même temps que le sédiment. Pour l'étude anaérobie, le sédiment et l'eau correspondante doivent être prélevés et transportés en évitant tout contact avec l'oxygène (28) (voir le paragraphe 1.8.2.1). Quelques dispositifs d'échantillonnage sont décrits dans la littérature (8)(23).

1.8.3.2 Manipulation

Le sédiment est séparé de l'eau par filtration et passé au travers d'un tamis de 2 mm en utilisant l'eau excédentaire prélevée sur le même site qui est ensuite éliminée. Des quantités connues de sédiments et d'eau sont ensuite mélangées dans le rapport désiré (voir le paragraphe 1.9.1) dans des flacons d'incubation et préparées pour la période d'acclimatation (voir le paragraphe 1.8.4). Pour l'étude anaérobie, toutes les étapes de la manipulation doivent être effectuées en absence d'oxygène (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3 Stockage

Il est vivement recommandé d'utiliser des sédiments et de l'eau fraîchement prélevés, mais si le stockage est nécessaire, le sédiment et l'eau doivent être tamisés comme décrit ci-avant et stockés ensemble, recouverts d'eau (couche d'eau de 6-10 cm), dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C⁴ pendant une durée maximale de 4 semaines (7)(8)(23). Les échantillons destinés aux études aérobies doivent être stockés en laissant un accès libre à l'air (dans des récipients ouverts), alors que les échantillons destinés aux études anaérobies doivent être conservés en absence d'oxygène. Il ne faut pas que le sédiment et l'eau soient congelés ni que le sédiment sèche pendant le transport et le stockage.

1.8.4 Préparation des échantillons de sédiment/eau pour l'essai

Une période d'acclimatation doit être respectée avant d'ajouter la substance d'essai, au cours de laquelle chaque échantillon de sédiment/eau est placé dans le récipient d'incubation à utiliser dans l'essai principal, et l'acclimatation est réalisée exactement dans les mêmes conditions que l'incubation de l'essai (voir le paragraphe 1.9.1). La période d'acclimatation est le temps nécessaire pour atteindre une stabilité suffisante du système, en termes de pH, de concentration de l'oxygène dans l'eau, de potentiel redox du sédiment et de l'eau, et de séparation macroscopique des phases. La période d'acclimatation doit durer normalement de une à deux semaines et elle ne doit pas excéder quatre semaines. Le résultat des déterminations effectuées pendant cette période doit être enregistré.

1.9 REALISATION DE L'ESSAI

1.9.1 Conditions de l'essai

L'essai doit être effectué dans le dispositif d'incubation (voir le paragraphe 1.8.1) avec un rapport de volume eau sédiment situé entre 3 : 1 et 4 : 1, et une couche sédimentaire de 2,5 cm (\pm 0,5 cm)⁴. On recommande une quantité minimale de 50 g de sédiment (sur une base de poids sec) par récipient d'incubation.

L'essai doit être effectué dans le noir à température constante dans la fourchette de 10 à 30 °C. La température indiquée est de (20 \pm 2) °C. Le cas échéant, une température supplémentaire plus basse (10 °C par exemple) peut être envisagée selon le cas, en fonction de l'information que l'on souhaite retirer de l'essai. La température d'incubation doit être surveillée et enregistrée.

1.9.2 Traitement et application de la substance d'essai

Une seule concentration d'essai de la substance chimique est utilisée⁵. Pour les produits phytosanitaires appliqués directement dans le milieu aquatique, le dosage maximal indiqué sur le mode d'emploi doit être pris comme taux maximal d'application calculé sur la base de la surface de l'eau dans le récipient d'essai. Dans tous les autres cas, la concentration à utiliser doit s'appuyer sur les estimations des émissions dans l'environnement. Il convient de veiller à appliquer une concentration de substance d'essai adéquate afin de caractériser la voie de transformation et la formation et le déclin des produits de transformation. Il peut être nécessaire d'appliquer des doses plus élevées (10 fois par exemple) dans le cas où les concentrations de la substance d'essai sont proches de la limite de détection au début de l'étude et/ou les principaux produits de transformation n'ont pas pu être facilement détectés à un taux égal à 10 % du taux d'application de la substance d'essai. Toutefois, si des concentrations d'essai plus élevées sont utilisées celles-ci ne doivent pas avoir un effet négatif important sur l'activité microbienne du système eau-sédiment. Afin d'obtenir une concentration constante de la substance d'essai dans des récipients de dimensions différentes, il peut être indiqué d'ajuster la quantité de produit appliqué, en fonction de la profondeur de la colonne d'eau dans le récipient par rapport à la profondeur de l'eau dans le champ (que l'on suppose égale à 100 cm, mais on peut prendre une autre profondeur comme base). Voir l'annexe 4 pour un exemple de calcul.

Théoriquement, la substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans la phase aqueuse du système d'essai. S'il n'est pas possible de procéder autrement, on peut utiliser de faibles quantités de solvants miscibles avec l'eau (comme l'acétone ou l'éthanol) pour appliquer et répartir la substance d'essai, mais ce solubilisant ne doit pas dépasser 1 % v/v ni avoir d'effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai. La solution aqueuse de la substance d'essai doit être préparée avec soin - afin d'assurer une homogénéité totale, on peut effectuer un pré-mélange et utiliser des colonnes de générateur. Après l'addition de la solution aqueuse au système d'essai, il est recommandé de remuer doucement la phase aqueuse en brassant le moins possible le sédiment.

Il n'est pas recommandé d'utiliser de manière routinière des produits formulés car les ingrédients de formulation risquent d'affecter la répartition de la substance d'essai et/ou des produits de transformation entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire. Toutefois, dans le cas de substances peu solubles dans l'eau, l'utilisation de matériau formulé peut être une solution de remplacement appropriée.

Le nombre de récipients d'incubation dépend du nombre de temps de prélèvement (voir le paragraphe 1.9.3). Un nombre suffisant de systèmes d'essai doit être prévu de façon à pouvoir sacrifier deux systèmes à chaque temps de prélèvement. Lorsqu'on utilise des unités témoins de chaque système sédimentaire aquatique, ces unités ne doivent pas être traitées avec la substance d'essai. Les unités témoins peuvent être utilisées pour déterminer la biomasse microbienne du sédiment et le carbone organique total de l'eau et du sédiment à la fin de l'étude. Deux unités témoins (une unité de chaque sédiment aquatique) peuvent être utilisées pour surveiller les paramètres requis dans le sédiment et dans l'eau pendant la période d'acclimatation (voir le tableau du paragraphe 1.8.2.2). Deux témoins supplémentaires doivent être ajoutés lorsque la substance d'essai est appliquée au moyen d'un solvant afin de mesurer les effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai.

1.9.3 Durée de l'essai et échantillonnage

L'expérience ne doit pas durer plus de 100 jours⁶, et elle doit se poursuivre jusqu'à ce que les voies de dégradation et le profil de répartition eau/sédiment se soient établis ou lorsque 90 % de la substance d'essai s'est dissipée par transformation et/ou volatilisation. Le nombre de temps de prélèvement doit être au moins égal à six (y compris le temps zéro), et une étude préliminaire facultative (voir le paragraphe 1.9.4) est effectuée pour déterminer le régime de prélèvement et la durée de l'essai, à moins que l'on ne dispose de données suffisantes sur la substance d'essai d'après les études antérieures. Pour les substances hydrophobes, il peut être nécessaire d'effectuer des points de prélèvement complémentaires pendant la période initiale afin de déterminer le taux de répartition entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire.

A chaque temps de prélèvement, les récipients d'incubation (réplicats) sont retirés pour analyse. Le sédiment et l'eau qui le recouvre sont analysés séparément⁶. L'eau de surface doit être retirée avec précaution en évitant autant que possible de toucher au sédiment. L'extraction et la caractérisation de la substance d'essai et des produits de transformation doivent suivre les procédures analytiques appropriées. Il faut prendre soin d'éliminer les matières adsorbées sur les parois du récipient d'incubation et dans les tuyaux utilisés pour piéger les produits volatils.

1.9.4 Essai préliminaire facultatif

S'il n'est pas possible de prévoir la durée et le régime d'échantillonnage à partir d'autres études analogues sur la substance d'essai, il peut être indiqué d'effectuer un essai préliminaire, dans les mêmes conditions d'essai que les conditions proposées pour l'étude définitive. Si cet essai préliminaire est effectué, les conditions expérimentales et les résultats de l'essai doivent être décrits brièvement.

1.9.5 Mesures et analyse

La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque temps de prélèvement dans l'eau et le sédiment doit être mesurée et enregistrée (en concentration et en pourcentage de la substance appliquée). En règle générale, tout produit de transformation détecté à \geq 10 % de la radioactivité totale appliquée au système eau/sédiment, quel que soit le temps de prélèvement, doit être identifié, à moins d'une justification suffisante. Les produits de transformation dont les concentrations sont en augmentation constante pendant la durée de l'étude doivent également être identifiés, même si leurs concentrations ne dépassent pas les limites indiquées ci-avant, car cela peut indiquer une persistance. Des justifications doivent être fournies dans le rapport.

Les résultats des systèmes de piégeage des gaz/volatils (CO₂ et autres, à savoir les composés organiques volatils) doivent être enregistrés à chaque temps de prélèvement. Les taux de minéralisation doivent être enregistrés. Les résidus (liés) non extractibles dans le sédiment doivent être notés à chaque temps de prélèvement.

2 DONNEES

2.1 TRAITEMENT DES RESULTATS

Le bilan massique total ou la récupération (voir le paragraphe 1.7.1) de la radioactivité ajoutée doit être calculé à chaque temps de prélèvement. Les résultats doivent être transcrits en pourcentage de radioactivité ajoutée. La répartition de la radioactivité entre l'eau et le sédiment doit être transcrite sous la forme de concentration et de pourcentage, à chaque temps de prélèvement.

La demi-vie, les valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai doivent être calculées avec leurs limites de confiance (voir le paragraphe 1.7.3). Différents outils d'évaluation permettent d'obtenir des informations sur le taux de dégradation de la substance d'essai dans l'eau et le sédiment. Il est possible d'appliquer des cinétiques du pseudo-premier ordre, des techniques d'interpolation empiriques utilisant des solutions graphiques ou numériques ou d'autres méthodes d'évaluation utilisant par exemple des modèles à un ou plusieurs compartiments. On trouvera plus de détails dans la littérature spécialisée (35)(36)(37).

Toutes les méthodes ont leurs avantages et leurs inconvénients et leur complexité varie considérablement. L'hypothèse d'une cinétique du premier ordre peut être une simplification trop poussée des processus de dégradation et de répartition, mais cette hypothèse, lorsque c'est possible, donne un terme (la constante de vitesse ou la demi-vie) facilement compréhensible et très utile en modélisation par simulation et pour calculer les concentrations prévisibles dans l'environnement. Les méthodes empiriques ou les transformations linéaires peuvent produire une meilleure interpolation entre les courbes et les données et permettre ainsi une meilleure estimation des demi-vies, des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90} . L'utilisation des constantes dérivées est toutefois limitée. Les modèles à compartiments servent à établir des constantes utiles pour l'évaluation des risques qui décrivent la vitesse de dégradation dans les différents compartiments et la répartition de la substance chimique. Ils doivent également être utilisés pour estimer les constantes de vitesse de formation et de dégradation des principaux produits de transformation. Dans tous les cas, la méthode choisie doit être justifiée et l'expérimentateur doit démontrer graphiquement et/ou statistiquement la qualité de l'ajustement.

3 RAPPORT

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit comprendre les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale (indiquant la position du marquage lorsqu'on utilise un produit radiomarké) et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- pureté (impuretés) de la substance d'essai;
- pureté radiochimique de la substance marquée et activité molaire (s'il y a lieu).

Substances de référence :

- nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation

Sédiments et eaux d'essai :

- localisation et description du (ou des) site(s) de prélèvement des sédiments aquatiques avec, si possible, l'historique de la contamination;
- toute information relative au prélèvement, au stockage (s'il y a lieu) et à l'acclimatation des systèmes eau-sédiment;
- caractéristiques des échantillons eau-sédiment telles qu'indiquées dans le tableau du paragraphe 1.8.2.2.

Conditions de l'essai :

- système d'essai utilisé (circulation continue, biomètre, mode de ventilation, méthode de remuage, volume d'eau, masse sédimentaire, épaisseur de la couche d'eau et de la couche de sédiment, dimension des récipients d'essai, etc.)
- application de la substance d'essai au système : concentration utilisée, nombre de réplicats et de témoins, mode d'application de la substance d'essai (usage éventuel de solvant), etc.
- température d'incubation;
- temps de prélèvement;
- méthodes d'extraction, rendements et limites de détection des méthodes analytiques;
- méthodes de caractérisation/identification des produits de transformation;
- modification du protocole d'essai ou des conditions de l'essai pendant l'étude.

Résultats :

- données brutes des analyses représentatives (toutes les données brutes doivent être conservées dans les archives BPL);
- reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées;
- taux de récupération (les % acceptables pour valider une étude sont présentés au paragraphe 1.7.1);
- tableaux des résultats exprimés en % de la dose appliquée et en $mg \times kg^{-1}$ dans l'eau, le sédiment et le système total (% uniquement) de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des produits de transformation et de la radioactivité non extractible;

- bilan massique pendant la durée et à la fin des expériences;
- représentation graphique de la transformation dans les fractions eau/sédiment et dans le système total (y compris la minéralisation);
- taux de minéralisation;
- durée de demi-vie, DT_{50} et, le cas échéant, valeurs DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation comprenant les limites de confiance dans l'eau, le sédiment et dans le système total;
- une évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, le cas échéant, des principaux produits de transformation;
- voie de transformation proposée, le cas échéant;
- discussion des résultats.

4 REFERENCES

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1 : Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides : Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- (4) Agriculture Canada : Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.
- (5) US-EPA : Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry : Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality - Sampling - Part 12 : Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG : Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts : Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A : Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993) : Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000) : Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spittler M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.
- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C -labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.
- (18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop « A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests », 3-4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds. : I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters : multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol. 329-338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

- (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2 : Fumigation-extraction method.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13-21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850-857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550.
- (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499-1509.
- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597-3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961-968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 39, 187 - 203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 33, 47 - 60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, pp 1349-1354.

Notes

(1) Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

(2) Comme ces solutions d'absorption alcalines absorbent également le dioxyde de carbone de l'air de ventilation et de l'air formé par la respiration dans les expériences aérobies, il convient de les changer à intervalles réguliers afin d'éviter leur saturation et par conséquent la perte de leur capacité d'absorption.

(3) [Argile + limon] est la fraction minérale du sédiment de granulométrie < 50 µm

(4) Selon des études récentes, un stockage à 4 °C peut entraîner une diminution de la teneur en carbone organique du sédiment ce qui risque d'entraîner une diminution de l'activité microbienne (34).

(5) Il peut être utile d'effectuer un essai avec une deuxième concentration pour les substances chimiques qui atteignent les eaux superficielles par différentes voies d'entrée ce qui entraîne des concentrations très différentes, dans la mesure où la concentration la plus faible peut être analysée avec une précision suffisante.

(6) Dans le cas où les produits de transformation anaérobie peuvent se ré-oxyder très rapidement, les conditions anaérobies doivent être maintenues pendant l'échantillonnage et l'analyse.

Annexe 1^{re}

INFORMATIONS SUR LES SYSTEMES D'ESSAI AEROBIES ET ANAEROBIES

Système d'essai aérobie

Le système d'essai aérobie décrit dans la présente méthode d'essai se compose d'une couche d'eau aérobie (généralement la concentration d'oxygène varie entre 7 et 10 mg×l⁻¹) et une couche de sédiment, aérobie à la surface et anaérobie sous la surface (généralement, le potentiel redox moyen (E_h) dans la zone anaérobie du sédiment est situé entre -80 et -190 mV). On fait passer de l'air humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir suffisamment d'oxygène dans l'espace libre.

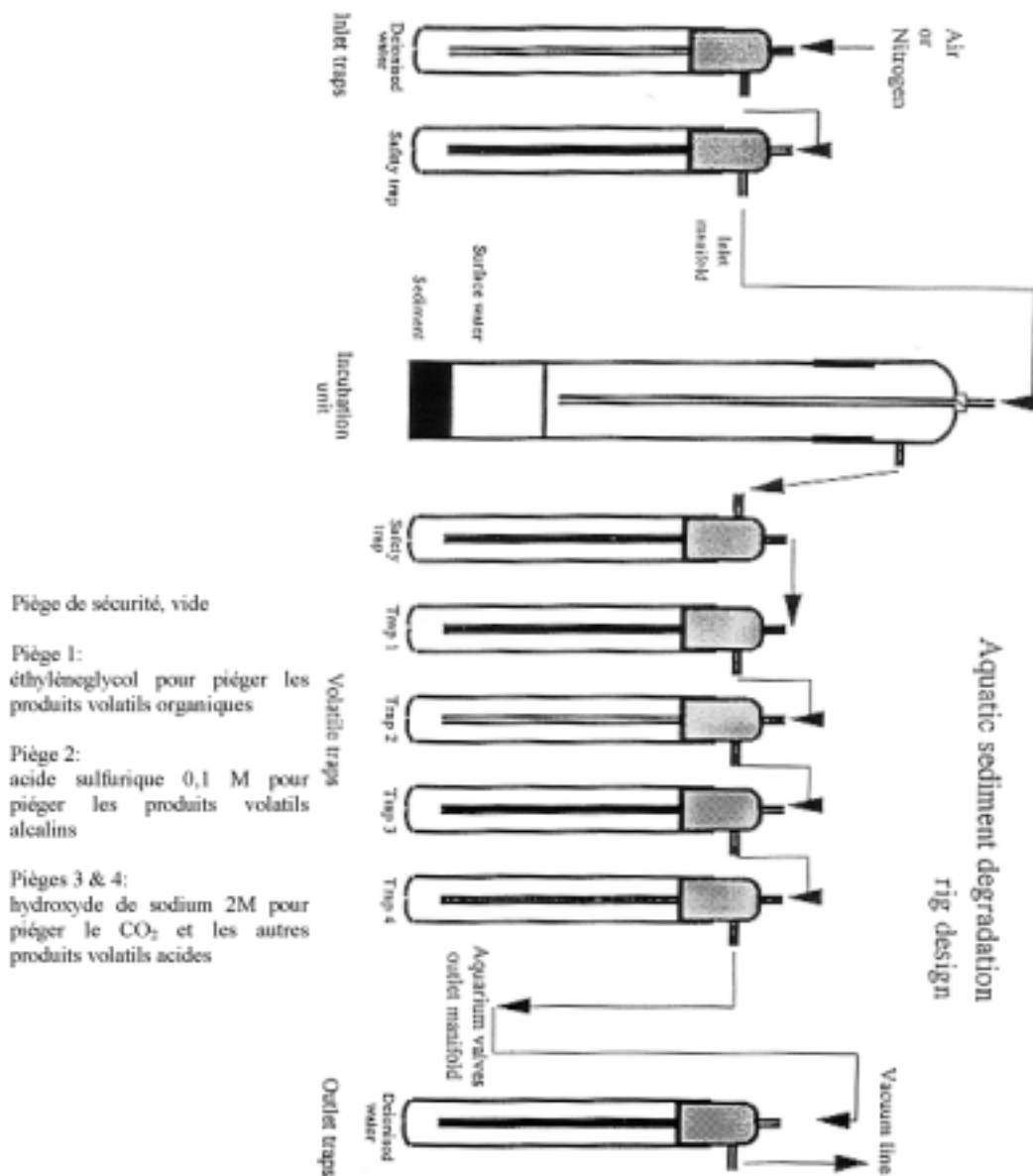
Système d'essai anaérobie

Dans le système d'essai anaérobie, la méthode d'essai est pratiquement la même que celle du système aérobie, à l'exception que l'on fait passer de l'azote humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir un espace libre d'azote. Le sédiment et l'eau sont considérés comme anaérobies lorsque le potentiel redox (E_h) est inférieur à -100 mV.

Dans l'essai anaérobie, l'évaluation de la minéralisation comprend la mesure du dioxyde de carbone et du méthane dégagé.

ANNEXE 2

EXEMPLE D'APPAREIL À CIRCULATION CONTINUE



Légende Annexe 2:

Aquatic sediment degradation rig design: Agencement du montage de dégradation en sédiment aquatique

Air or nitrogen: Air ou azote

Vacuum line: Ligne de vide

Safety trap: Piège de sécurité

Sediment: Sédiment

Safety trap: Piège de sécurité

Aquarium valves outlet manifold: Tubulure de sortie à valves

Inlet traps: Pièges d'entrée

Inlet manifold: Tubulure d'entrée

Deionised water: Eau désionisée

Surface water: Eau de surface

Incubation unit: Unité d'incubation

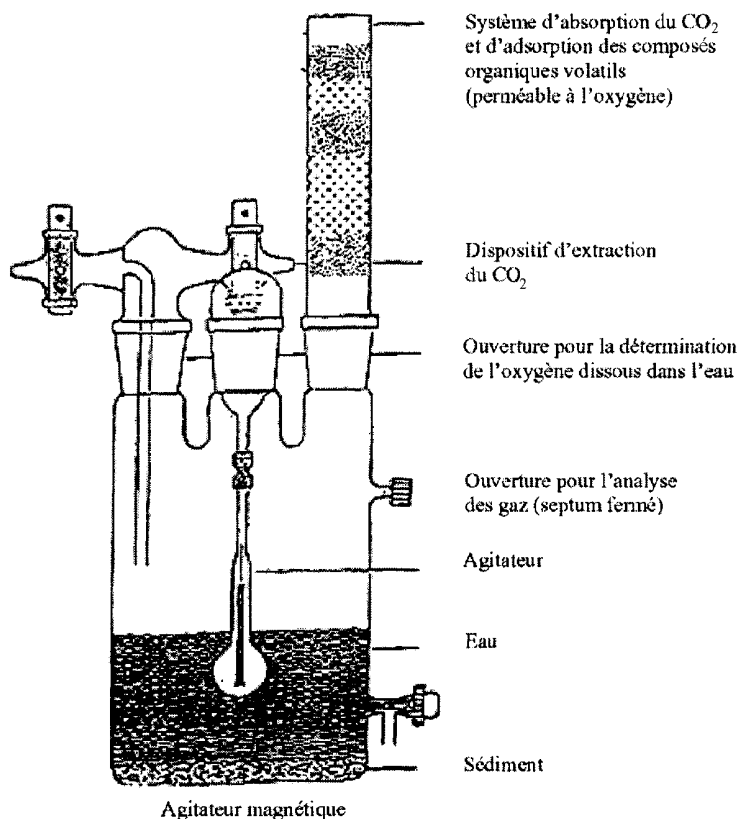
Volatile traps: Pièges à produits volatils

Aquarium valves outlet manifold: Tubulure de sortie à valves

Outlet traps: Piège de sortie

ANNEXE 3

EXEMPLE DE BIOMÈTRE



ANNEXE 4

EXEMPLE DE CALCUL DE LA DOSE À APPLIQUER AUX RÉCIPIENTS D'ESSAI

Diamètre interne du cylindre:	= 8 cm
Profondeur de la colonne d'eau excluant le sédiment:	= 12 cm
Surface: $3,142 \times 4^2$	= $50,3 \text{ cm}^2$
Taux d'application: 500 g de substance d'essai/ha correspondent à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	
Total en μg : $5 \times 50,3$	= $251,5 \mu\text{g}$
Ajuster la quantité par rapport à la quantité correspondant à une profondeur de 100 cm: $12 \times 251,5 \div 100$	= $30,18 \mu\text{g}$
Volume de la colonne d'eau: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Concentration dans l'eau: $30,18 \div 603$	= $0,050 \mu\text{g}/\text{ml}$ ou $50 \mu\text{g}/\text{l}$ »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 17 mars 2005.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de la Santé publique,
R. DEMOTTE

Le Ministre de l'Environnement,
B. TOBBACK

Bijlage 1 A

« A.21. OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN (VLOEISTOFFEN)

1. METHODE

1.1 INLEIDING

Deze testmethode is bedoeld om te meten in hoeverre een vloeistof de verbrandingssnelheid of verbrandingsintensiteit van een brandbare stof kan verhogen of met een brandbare stof een mengsel kan vormen dat spontaan ontbrandt wanneer beide stoffen grondig worden gemengd. De test is gebaseerd op de test voor oxiderende vloeistoffen van de VN (1) en is hieraan gelijkwaardig. Aangezien deze methode A.21 echter in de eerste plaats is bedoeld om te voldoen aan de vereisten van koninklijk besluit van 24 mei 1982, is slechts een vergelijking met één referentiestof vereist. Testen en vergelijken met bijkomende referentiestoffen kan nodig zijn wanneer het waarschijnlijk is dat de testresultaten voor andere doeleinden worden gebruikt¹.

Deze test hoeft niet te worden uitgevoerd wanneer op grond van de structuurformule met afdoende zekerheid kan worden vastgesteld dat de stof niet exotherm kan reageren met een brandbare stof.

Het is nuttig om, voordat deze test wordt uitgevoerd, te beschikken over gegevens over de mogelijke explosieve eigenschappen van de te onderzoeken stof.

Deze test is niet toepasbaar op vaste stoffen, gassen, explosieve of licht ontvlambare stoffen of organische peroxiden.

Deze test hoeft eventueel niet te worden uitgevoerd wanneer voor de te onderzoeken stof al resultaten beschikbaar zijn van de test voor oxiderende vloeistoffen van de VN (1).

1.2 DEFINITIES EN EENHEDEN

Gemiddelde stijgtijd van de druk : het gemiddelde van de gemeten tijden waarin een mengsel tijdens de test een drukstijging veroorzaakt van 690 kPa tot 2.070 kPa boven de atmosferische druk.

1.3 REFERENTIESTOF

Als referentiestof wordt een waterige oplossing van 65 gewichtsprocent salpeterzuur (analytisch zuiver) gebruikt².

Wanneer de experimentator verwacht dat de testresultaten wellicht voor andere doeleinden worden gebruikt¹, kan het wenselijk zijn de test met bijkomende referentiestoffen uit te voeren³.

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De testvloeistof wordt in een massaverhouding van 1:1 met cellulosevezel gemengd en in een drukvat gebracht. Indien tijdens het mengen of vullen spontane ontbranding optreedt, is verder testen niet nodig.

Indien geen spontane ontbranding optreedt, wordt de volledige test uitgevoerd. Het mengsel wordt in een drukvat verwarmd en de gemiddelde tijd waarin de druk stijgt van 690 kPa tot 2.070 kPa boven de atmosferische druk, wordt gemeten. Deze tijd wordt vergeleken met de gemiddelde stijgtijd voor de druk voor het 1:1-mengsel van de referentiestof(fen) en cellulose.

1.5 KWALITEITSCRITEARIA

In een reeks van vijf proeven met dezelfde stof mag geen van de resultaten meer dan 30 % afwijken van het rekenkundig gemiddelde. Resultaten die meer dan 30 % van het gemiddelde afwijken, moeten worden verworpen, de meng- en vulprocedure moet worden verbeterd en de test moet worden herhaald.

1.6 BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.6.1 Voorbereiding

1.6.1.1 Brandbare stof

Als brandbare stof wordt droge cellulose met een vezellengte tussen 50 en 250 µm en een gemiddelde diameter van 25 µm gebruikt⁴. Dit wordt gedurende 4 uur in een laag van ten hoogste 25 mm dik bij 105°C gedroogd tot constant gewicht en in een exsiccator met droogmiddel bewaard totdat de vezel is afgekoeld en wordt gebruikt. Het watergehalte van de gedroogde cellulose moet minder zijn dan 0,5 % van de droge massa⁵. Zo nodig dient de droogtijd te worden verlengd tot deze waarde is bereikt⁶. Gedurende de hele test wordt een en dezelfde batch cellulose gebruikt.

1.6.1.2 Apparatuur

1.6.1.2.1 Drukvat

Voor de test wordt gebruik gemaakt van een drukvat. Dit is een cilindrisch stalen drukvat met een lengte van 89 mm en een uitwendige diameter van 60 mm (zie figuur 1). De cilinder wordt zo bewerkt dat aan de buitenkant recht tegenover elkaar twee vlakke zijden ontstaan (waardoor de doorsnede van het vat wordt gereduceerd tot 50 mm) zodat de cilinder gemakkelijker kan worden gemanipuleerd wanneer de ontstekingsplug en ontluchtingsplug worden aangebracht. Het vat, dat een inwendige diameter van 20 mm heeft, wordt aan beide uiteinden tot een diepte van 19 mm opgeruimd en voorzien van een schroefdraad voor 1" British Standard Pipe (BSP) of het metrische equivalent daarvan. Op 35 mm van een van de uiteinden wordt op 90° van de vlakke oppervlakken in het gebogen oppervlak van het vat een zijbuis geschroefd om de druk op te nemen. Daarvoor wordt een 12 mm diep gat geboord dat wordt voorzien van schroefdraad voor de 1/2" BSP (of metrisch equivalent) schroefdraad op het uiteinde van de zijbuis. Zo nodig wordt een inerte pakking aangebracht om een gasdichte verbinding te bekomen. De zijbuis steekt 55 mm buiten het drukvat uit en heeft een inwendige diameter van 6 mm. Het uiteinde van de zijbuis wordt opgeruimd en voorzien van een schroefdraad voor een membraanmanometer. Elk type manometer mag worden gebruikt, op voorwaarde dat de manometer bestand is tegen de hete gassen of ontledingsproducten en kan reageren op een drukstijging van 690-2.070 kPa in maximaal 5 ms.

Het uiteinde van het drukvat dat het verst verwijderd is van de zijbuis, wordt afgesloten met een ontstekingsplug met twee elektrodes, de ene geïsoleerd van de plug, de andere via de plug met de massa verbonden. Het andere uiteinde van het drukvat wordt afgesloten met een breekplaat (barstdruk ongeveer 2.200 kPa) die op zijn plaats wordt gehouden met een bevestigingsplug met een inwendige diameter van 20 mm. Zo nodig wordt voor de ontstekingsplug een inerte pakking gebruikt om een gasdichte verbinding te bekomen. Het drukvat wordt tijdens het gebruik in de juiste positie gehouden met een statief (figuur 2). Dit bestaat doorgaans uit een zachtstalen grondplaat van 235 mm x 184 mm x 6 mm en een 185 mm lange vierkante buis van 70 mm x 70 mm x 4 mm.

Van twee tegenover elkaar gelegen zijkanten van de vierkante buis wordt een deel verwijderd zodat een buis van 86 mm lengte overblijft die uitloopt in twee vlakke benen. De uiteinden van deze vlakke benen worden onder een hoek van 60° ten opzichte van de as van de buis afgekort en op de grondplaat gelast. Aan de bovenkant van de vierkante buis wordt in één zijkant een gleuf van 22 mm breed x 46 mm diep uitgefreesd, zodat de zijbuis in de gleuf valt wanneer het drukvat met de ontstekingsplug naar beneden in de vierkante buis wordt geplaatst. Op de onderste binnenzijde van de vierkante buis wordt een stuk staal van 30 mm breed en 6 mm dik gelast als afstandstuk. In de tegenoverliggende zijde worden twee 7 mm vleugelschroeven gedraaid om het drukvat stevig op zijn plaats te houden. Om het drukvat van onderen te steunen worden op de zijkanten die doorlopen naar de basis van het statief, twee stroken van 12 mm breed en 6 mm dik staal gelast.

1.6.1.2.2 Ontstekingsstelsel

Het ontstekingsstelsel bestaat uit een 25 cm lange Ni/Cr-draad met een diameter van 0,6 mm en een weerstand van 3,85 ohm/m. De draad wordt om een staaf met een diameter van 5 mm tot een spoel gewikkeld en met de elektrodes van de ontstekingsplug verbonden. De spoel moet een van de in figuur 3 afgebeelde configuraties hebben. De afstand tussen de bodem van het vat en de onderzijde van de ontstekingsspoel moet 20 mm bedragen. Wanneer de elektroden niet instelbaar zijn, moeten de einden van de ontstekingsdraad tussen de spoel en de bodem van het vat met een keramische mantel worden geïsoleerd. De draad wordt verhit met een voeding die een constante stroom van ten minste 10 A kan leveren.

1.6.2 Uitvoering van de test⁷

Het toestel wordt met manometer en verhittingsstelsel, maar zonder de breekplaat, met de ontstekingsplug naar beneden neergezet. In een glazen beker worden met een glazen roerstaaf 2,5 g testvloeistof en 2,5 g gedroogde cellulose gemengd⁸. Om veiligheidsredenen moet tijdens het mengen een veiligheidsschild tussen de experimentator en het mengsel zijn geplaatst. Indien het mengsel tot ontbranding komt tijdens het mengen of vullen, zijn geen verdere tests nodig. Het mengsel wordt in kleine hoeveelheden tegelijk in het drukvat gegoten, terwijl tegen het drukvat wordt geklopt om ervoor te zorgen dat het mengsel de ruimte rond de ontstekingsspoel vult en daarmee goed contact maakt. Het is belangrijk dat de spoel tijdens het vullen niet verbuigt, aangezien dit tot foutieve resultaten kan leiden⁹. De breekplaat wordt op zijn plaats gebracht en de bevestigingsplug wordt stevig vastgeschroefd. Het gevulde drukvat wordt met de breekplaat naar boven in het statief geplaatst. De gehele opstelling moet zich in een geschikte gewapende afzuigkast of ontstekingskast bevinden. De voeding wordt aangesloten op de uitwendige aansluitingen van de ontstekingsplug. De stroomsterkte bedraagt 10 A. De tijd tussen het begin van het mengen en het inschakelen van de voeding mag niet langer zijn dan 10 minuten.

Het signaal van de manometer wordt geregistreerd met een systeem waarmee het drukverloop kan worden geanalyseerd en continu kan worden geregistreerd (bijv. een transiëntrecorder gekoppeld aan een papierschrijver). Het mengsel wordt verwarmd tot de breekplaat breekt of totdat ten minste 60 seconden zijn verstreken. Als de breekplaat niet breekt, moet het mengsel afkoelen voordat het toestel voorzichtig wordt geopend, waarbij de nodige voorzorgen worden getroffen voor het geval een plotselinge drukstijging optreedt. Er worden vijf proeven uitgevoerd met de teststof en de referentiestof(fen). De tijd waarin de druk stijgt van 690 kPa tot 2.070 kPa boven de atmosferische druk, wordt genoteerd. Vervolgens wordt de gemiddelde stijgtijd van de druk berekend.

In sommige gevallen kunnen stoffen een (te hoge of te lage) drukstijging veroorzaken als gevolg van chemische reacties die niet relevant zijn voor de oxiderende eigenschappen van de stof. In die gevallen kan het nodig zijn de test te herhalen met een inerte stof, bijvoorbeeld diatomiet (kieselgoehr), in plaats van cellulose, om het karakter van de reactie te bepalen.

2 GEGEVENS

Stijgtijd voor de teststof en voor de referentiestof(fen).

Stijgtijd voor de tests met een inerte stof, indien uitgevoerd.

2.1 VERWERKING VAN DE RESULTATEN

De gemiddelde stijgtijden van de druk voor de teststof en de referentiestof(fen) worden berekend.

De gemiddelde stijgtijd voor de tests met een inerte stof (indien uitgevoerd) wordt berekend.

Tabel 1 bevat enkele voorbeelden van resultaten

Tabel 1

Voorbeelden van resultaten ^{d)}

Stof ^{c)}	Gemiddelde stijgtijd voor een 1:1 mengsel met cellulose (ms)
Ammoniumdichromaat, verzadigde waterige oplossing	20800
Calciumnitraat, verzadigde waterige oplossing	6700
IJzer(III)nitraat, verzadigde waterige oplossing	4133
Lithiumperchloraat, verzadigde waterige oplossing	1686
Magnesiumperchloraat, verzadigde waterige oplossing	777
Nikkelnitraat, verzadigde waterige oplossing	6250
Salpeterzuur, 65 %	4767 ^{a)}
Perchloorzuur, 50 %	121 ^{a)}
Perchloorzuur, 55 %	59
Kaliumnitraat, 30 % waterige oplossing	26690
Zilvernitraat, verzadigde waterige oplossing	_b)
Natriumchloraat, 40 % waterige oplossing	2555 ^{a)}
Natriumnitraat, 45 % waterige oplossing	4133
<i>Inerte stof</i>	
Water :cellulose	_b)

a) Gemiddelde waarde van vergelijkende interlaboratoriumproeven

b) Maximumdruk van 2.070 kPa niet bereikt

c) Verzadigde oplossingen worden bij 20°C bereid

d) Zie referentie (1) voor indeling volgens de vervoersvoorschriften van de VN.

3 RAPPORTAGE

3.1 VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

- — identiteit, samenstelling, zuiverheid, enz. van de teststof;
- — concentratie van de teststof;
- — procedure voor het drogen van de cellulose;
- — watergehalte van de gebruikte cellulose;
- — de meetresultaten;
- — eventuele resultaten van tests met een inerte stof;
- — berekende gemiddelde stijgtijden van de druk;
- — eventuele afwijkingen van deze methoden en redenen daarvoor;
- — alle verdere informatie of opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN¹⁰

De testresultaten worden beoordeeld op grond van :

a) de vraag of het mengsel van teststof en cellulose spontaan ontbrand; en

b) een vergelijking van de gemiddelde stijgtijd voor de druk van 690 KPa naar 2.070 kPa met die voor de referentiestof(fen).

Een vloeistof wordt aangemerkt als een oxiderende stof wanneer :

a) een mengsel in een 1:1 massaverhouding van de stof en cellulose spontaan ontbrand, of

b) een mengsel in een massaverhouding van 1:1 van de stof en cellulose een gemiddelde stijgtijd oplevert kleiner dan of gelijk aan de gemiddelde stijgtijd van de druk van een mengsel in een 1:1 massaverhouding van een waterige oplossing van 65 gewichtsprocent salpeterzuur en cellulose.

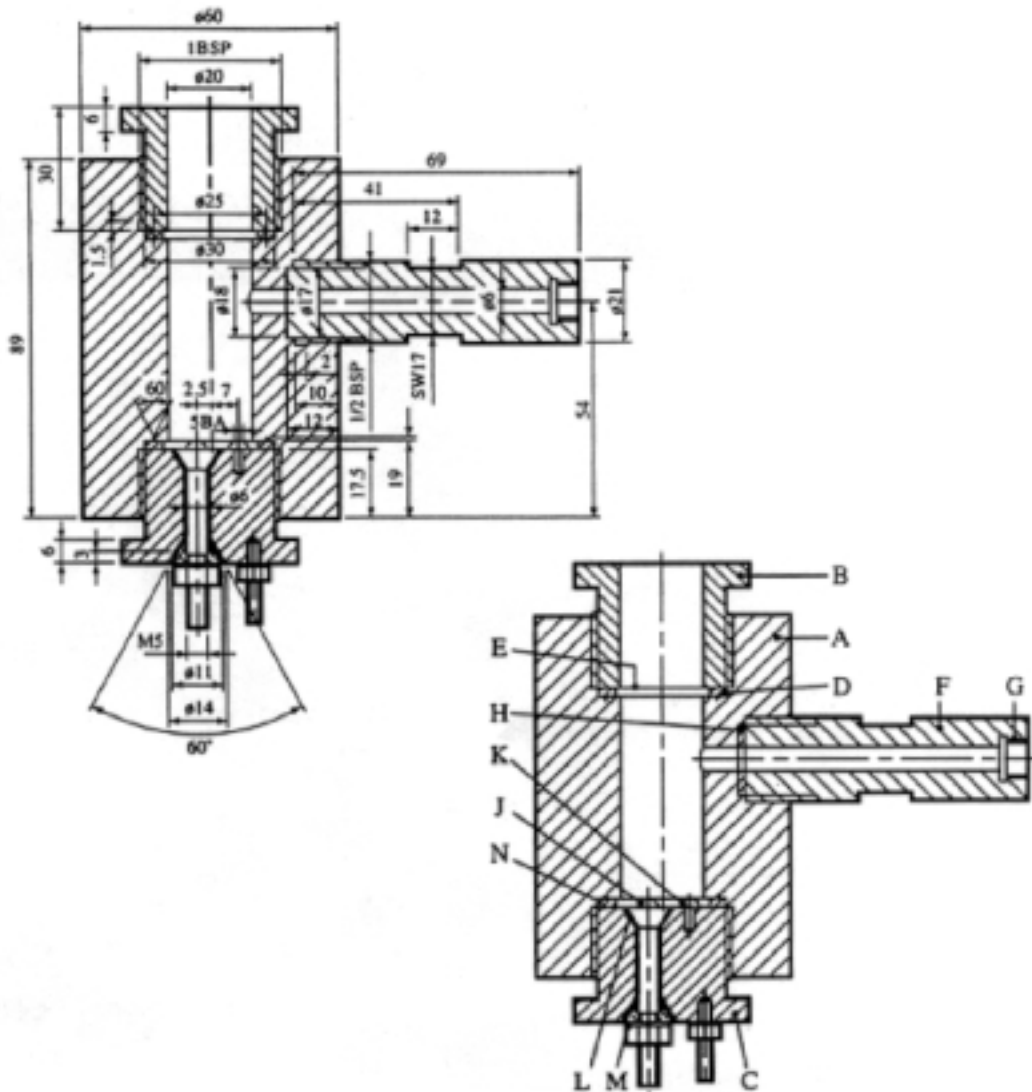
Om vals-positieve resultaten te vermijden, moet bij de interpretatie van de resultaten zo nodig ook rekening worden gehouden met resultaten verkregen bij het testen van de stof gemengd met inert materiaal.

4 REFERENTIES

- (1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No : ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2 : Test for oxidizing liquids.

Figuur 1

Drukvat



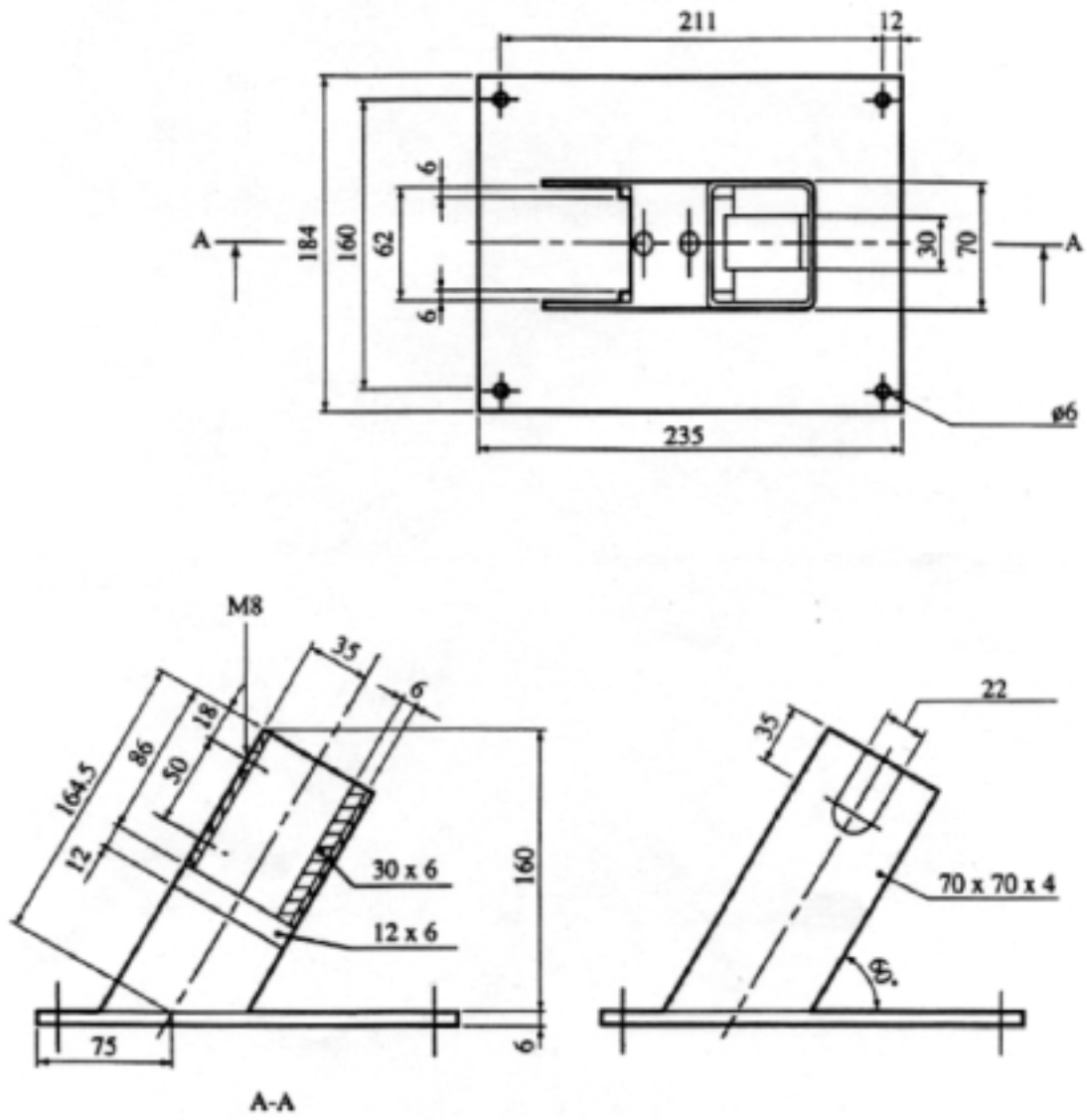
(A) Drukvat
 (D) Zachtloden pakking
 (G) Manometerkop
 (K) Geaarde elektrode
 (N) Groef voor pakking

(B) Bevestigingsplug breekplaat
 (E) Breekplaat
 (H) Pakking
 (L) Isolatie

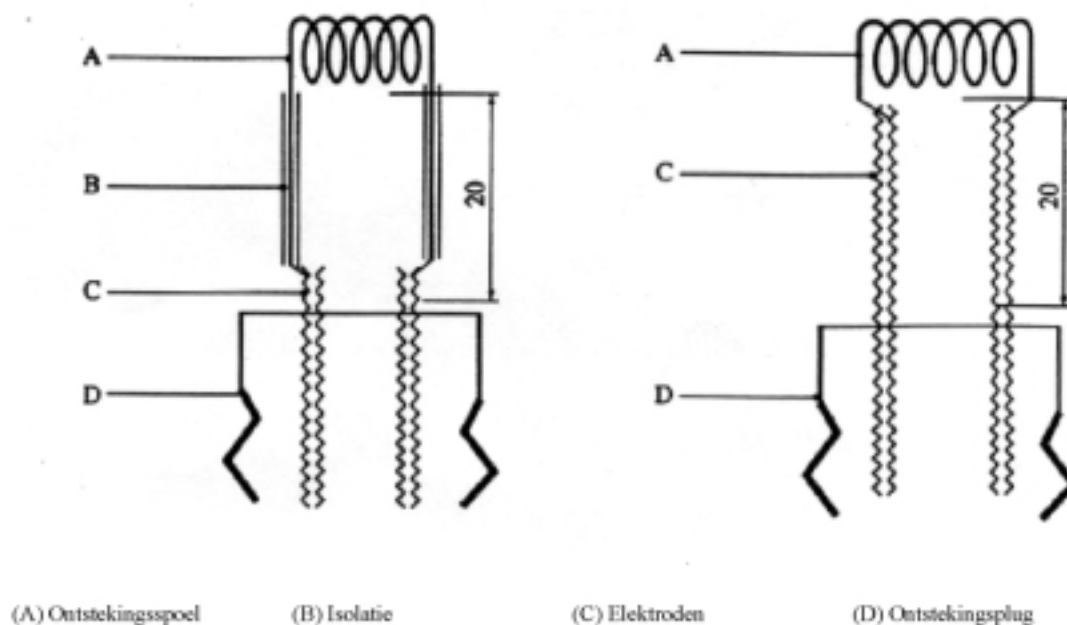
(C) Ontstekingsplug
 (F) Zijbuis
 (J) Geïsoleerde elektrode
 (M) Stalen conus

Figuur 2

Statief



Figuur 3
Ontstekingssysteem



Opmerking: Beide ontstekingsystemen kunnen worden gebruikt.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Nota's

¹ Bijvoorbeeld in het kader van de vervoersvoorschriften van de VN.

² Het zuur moet vóór de test worden getitreerd om de concentratie ervan te bevestigen.

³ In referentie 1 wordt bijvoorbeeld gebruik gemaakt van 50 gewichtprocent perchloorzuur en 40 gewichtprocent natriumchloraat.

⁴ Bijvoorbeeld Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, catalogue n° 4021 050.

⁵ Bevestigd met (bijvoorbeeld) Karl-Fisher titratie.

⁶ Een andere mogelijkheid om dit watergehalte te bereiken is (bijv.) verhitting bij 105° C onder vacuüm gedurende 24 uur.

⁷ Mengsels van oxiderende stoffen en cellulose kunnen explosief zijn en moeten met de nodige voorzichtigheid worden behandeld.

⁸ In de praktijk kan dit worden gedaan door een grotere hoeveelheid testvloeistof en cellulose te mengen in een verhouding 1 : 1 en vervolgens 5 ± 0,1 g van het mengsel in het drukvat te brengen. Het mengsel moet voor elke proef vers worden bereid.

⁹ Met name moet contact tussen opeenvolgende wikkelingen van de spoel worden vermeden.

¹⁰ Zie referentie 1 referentie voor interpretatie van de resultaten onder de vervoersvoorschriften van de VN met verschillende referentiestoffen.

Bijlage 1 B

« B.1 BIS. ACUTE ORALE TOXICITEIT : PROCEDURE MET VASTE DOSES

1 METHODE

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 420 (2001) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Bij klassieke methoden voor de bepaling van de acute toxiciteit wordt de dood van dieren als eindpunt gebruikt. In 1984 is door de British Toxicology Society een nieuwe aanpak voor acute toxiciteitstests voorgesteld op basis van de toediening van een reeks vaste doses (1). Deze aanpak gebruikt niet meer de dood van dieren als eindpunt, maar berust op de observatie van duidelijke toxiciteitsverschijnselen bij één van een reeks vaste doses. Na *in vivo* valideringsonderzoek in het VK (2) en in internationaal verband (3) is deze procedure in 1992 als testmethode goedgekeurd. Vervolgens zijn de statistische eigenschappen van de procedure met vaste doses bij een reeks onderzoeken met behulp van mathematische modellen geëvalueerd (4) (5) (6). Met de combinatie van *in vivo* onderzoek en modellen is aangetoond dat de procedure reproduceerbaar is, minder dieren gebruikt en minder leed veroorzaakt dan de klassieke methoden en stoffen op een vergelijkbare wijze kan rangschikken als de andere testmethoden voor acute toxiciteit.

Richtsnoeren voor de keuze van de meest geschikte testmethode voor een bepaald doel worden gegeven in de leidraad voor tests op acute orale toxiciteit (7). Deze leidraad bevat ook aanvullende informatie over de uitvoering en interpretatie van testmethode B.1bis.

De methode heeft als beginsel dat bij het hoofdonderzoek slechts beperkt toxische doses worden gebruikt en dat de toediening van doses waarvan wordt verwacht dat ze dodelijk zijn, moet worden vermeden. Ook doses waarvan bekend is dat ze door een bijtende of sterk irriterende werking hevige pijn en leed veroorzaken, behoeven niet te worden toegediend. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevige en voortdurend leed vertonen, worden op humane wijze gedood en worden bij de interpretatie van de testresultaten op dezelfde manier behandeld als dieren die tijdens de test gestorven zijn. Er is een aparte leidraad met criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen (8).

De methode levert informatie over de gevaarlijke eigenschappen op en maakt het mogelijk de stof te rangschikken en in te delen aan de hand van het « Globally Harmonised System » (GHS) voor de indeling van chemische stoffen die acute toxiciteit veroorzaken (9).

Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Hierbij gaat het om informatie als de identiteit en de chemische structuur van de stof, de fysisch-chemische eigenschappen, de resultaten van andere met de stof uitgevoerde toxiciteitstests *in vivo* of *in vitro*, toxicologische gegevens over qua structuur verwante stoffen en de voorgenomen toepassing(en) van de stof. Deze informatie is nodig om alle betrokkenen ervan te overtuigen dat de test relevant is voor de bescherming van de gezondheid van de mens en helpt tevens bij de keuze van een geschikte aanvangsdosis.

1.2 DEFINITIES

Acute orale toxiciteit : de schadelijke effecten die zich voordoen na orale toediening van één dosis van een stof of verschillende doses die binnen 24 uur worden toegediend.

Vertraagde sterfte : houdt in dat een dier niet binnen 48 uur sterft of stervende is maar later gedurende de observatieperiode van 14 dagen sterft.

Dosis : de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bijvoorbeeld mg/kg).

Manifeste toxiciteit : een algemene term die zodanige duidelijke toxiciteitsverschijnselen na de toediening van de teststof beschrijft (zie (3) voor voorbeelden), dat bij de eerstvolgende vaste dosis hevige pijn en blijvende verschijnselen van ernstig leed, stervende dieren (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor criteria) of waarschijnlijke sterfte bij de meeste dieren kunnen worden verwacht.

GHS : het "Globally Harmonised Classification System" voor chemische stoffen en mengsels. Een samenwerkingsproject van de OESO (gezondheid van de mens en milieu), het Comité van deskundigen voor het vervoer van gevaarlijke goederen van de VN (fysisch-chemische eigenschappen) en de ILO (communicatie van gevaren) dat wordt gecoördineerd door het Gezamenlijk programma voor een verantwoord beheer van chemische stoffen (IOMC).

Ophanden zijnde sterfte : wanneer vóór het eerstvolgende geplande observatietijdstip een stervende toestand of sterfte wordt verwacht. Voorbeelden van indicaties voor deze toestand bij knaagdieren zijn convulsies, zijligging, liggende positie en tremors (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor meer bijzonderheden).

LD₅₀ (mediaan van de letale dosis) : een statistisch afgeleide enkelvoudige dosis van een stof waarvan kan worden verwacht dat 50 % van de dieren waaraan deze dosis oraal wordt toegediend, sterft. De LD₅₀ wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (mg/kg).

Limietdosis : een dosis die bij tests als bovengrens wordt gehanteerd (2 000 of 5 000 mg/kg).

Stervende toestand : een toestand waarop de dood volgt of waarin overleven onmogelijk is, zelfs wanneer het dier wordt behandeld (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor meer bijzonderheden).

Voorspelbare sterfte : een toestand met klinische verschijnselen die wijzen op sterfte op een bekend tijdstip in de toekomst vóór het geplande einde van het experiment, bijvoorbeeld wanneer het dier geen water of voer kan bereiken (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor meer bijzonderheden).

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Groepen met dieren van hetzelfde geslacht krijgen stapsgewijs de vaste doses 5, 50, 300 en 2 000 mg/kg toegediend (bij wijze van uitzondering kan een extra vaste dosis van 5 000 mg/kg worden overwogen; zie punt 1.6.2). Op basis van een verkennende test wordt de aanvangsdosis gekozen, waarvan wordt verwacht dat er enige toxiciteitsverschijnselen optreden zonder dat er sprake is van ernstige toxische effecten of sterfte. Klinische verschijnselen en situaties die gepaard gaan met pijn, leed en ophanden zijnde sterfte, worden gedetailleerd in een aparte OESO-leidraad beschreven (8). Afhankelijk van het al dan niet optreden van toxiciteitsverschijnselen of sterfte kan er aan andere groepen dieren een hogere of lagere dosis worden toegediend. Deze procedure wordt gestaakt zodra de dosis wordt bepaald waarbij manifeste toxiciteit optreedt of ten hoogste één dier sterft, of wanneer blijkt dat er bij de hoogste dosis geen effecten worden geconstateerd of bij de laagste dosis dieren sterven.

1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 Keuze van de diersoort

Bij voorkeur wordt de rat gebruikt, maar ook andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt. Normaal gesproken worden vrouwtjes gebruikt (7), omdat uit literatuuronderzoek van klassieke LD₅₀-tests blijkt dat er meestal weinig verschil in gevoeligheid tussen mannetjes en vrouwtjes is, maar wanneer er een verschil wordt geconstateerd, zijn vrouwtjes meestal iets gevoeliger (10). Als echter uit kennis omtrent de toxicologische of toxicokinetische eigenschappen van qua structuur verwante chemische stoffen blijkt dat mannetjes waarschijnlijk gevoeliger zullen zijn, moeten mannetjes worden gebruikt. Wanneer de test bij mannetjes wordt uitgevoerd, moet hiervoor een afdoende motivering worden gegeven.

Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Elk dier moet bij de eerste toediening 8 tot 12 weken oud zijn en het lichaamsgewicht mag niet meer dan $\pm 20\%$ afwijken van het gemiddelde gewicht van dieren waaraan al eerder een dosis is toegediend.

1.4.2 Huisvesting en voeding

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbepaalde hoeveelheid drinkwater. De dieren mogen per dosis in groepen worden gehuisvest, maar het aantal dieren per kooi mag niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord.

1.4.3 Voorbereiding van de dieren

De dieren worden aseptic ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

1.4.4 Bereiding van de dosis

In het algemeen worden alle doses van de teststof in het hele testbereik in een constant volume toegediend door de concentratie van de toegediende dosis te variëren. Wanneer echter een vloeibaar eindproduct of mengsel wordt getest, kan het voor de latere risicobeoordeling van die stof zinvoller zijn de teststof onverdund, d.w.z. met een constante concentratie, te gebruiken en sommige regelgevende instanties hebben dit verplicht gesteld. Het maximaal toe te dienen volume mag echter in geen geval worden overschreden. Het is afhankelijk van de grootte van het proefdier welk volume vloeistof in één keer kan worden toegediend. Bij knaagdieren mag het volume normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden overwogen. Voor de formulering van de dosis wordt waar mogelijk het gebruik van een waterige oplossing/suspensie/emulsie aanbevolen, in volgorde van voorkeur gevolgd door een oplossing/suspensie/emulsie in olie (bijvoorbeeld maïsolie) en eventueel een oplossing in een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxicologische kenmerken van het medium bekend zijn. De dosis moet kort vóór de toediening worden bereid, tenzij de stabiliteit van het preparaat gedurende de gebruikperiode bekend is en is aangetoond dat deze aanvaardbaar is.

1.5 PROCEDURE

1.5.1 Toediening van de dosis

De teststof wordt in één dosis toegediend met een maagsonde of een geschikte katheter. In het uitzonderlijke geval dat één dosis niet mogelijk is, kan de dosis in kleinere porties worden verdeeld die in de loop van maximaal 24 uur worden toegediend.

De dieren moeten vóór de toediening vasten (ratten mogen bijvoorbeeld de nacht vóór de toediening geen voer maar wel water krijgen en muizen gedurende 3-4 uur). Na de vastperiode worden de dieren gewogen en wordt de teststof toegediend. Na de toediening van de stof kan men ratten nog eens 3-4 uur en muizen nog eens 1-2 uur laten vasten. Wanneer een dosis in de loop van de tijd in porties wordt toegediend, kan het afhankelijk van de lengte van de periode nodig zijn de dieren voer en water te geven.

1.5.2 Verkennende test

De verkennende test is bedoeld om de juiste aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek te kunnen kiezen. De teststof wordt overeenkomstig het stroomschema in bijlage 1 achtereenvolgens telkens aan één dier toegediend. De verkennende test is afgelopen wanneer er een beslissing kan worden genomen over de aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek (of als er bij de laagste vaste dosis een dier sterft).

Als aanvangsdosis voor de verkennende test wordt uit de vaste doses 5, 50, 300 en 2 000 mg/kg de dosis gekozen waarvan wordt verwacht dat er manifeste toxiciteit optreedt, waar mogelijk op basis van gegevens uit *in vitro* en *in vivo* onderzoek met dezelfde chemische stof en andere qua structuur verwante chemische stoffen. Wanneer deze informatie niet beschikbaar is, wordt 300 mg/kg als aanvangsdosis gebruikt.

Er wordt ten minste 24 uur gewacht voordat een dosis aan het volgende dier wordt toegediend. Alle dieren worden gedurende ten minste 14 dagen geobserveerd.

Bij wijze van uitzondering kan alleen met een motivering op basis van specifieke regelgevingsvereisten daarnaast het gebruik van een hogere vaste dosis van 5 000 mg/kg worden overwogen (zie bijlage 3). Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven in GHS-categorie 5 tot 2000-5 000 mg/kg niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die test van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van mensen of dieren of het milieu.

Wanneer een dier waaraan bij de verkennende test de laagste vaste dosis (5 mg/kg) is toegediend, sterft, is de normale procedure dat de test wordt afgesloten en de stof wordt ingedeeld in GHS-categorie 1 (zie bijlage 1). Als de indeling echter moet worden bevestigd, kan de volgende facultatieve aanvullende procedure worden uitgevoerd. De dosis van 5 mg/kg wordt aan een tweede dier toegediend. Als dit tweede dier sterft, is de indeling in GHS-categorie 1 bevestigd en wordt het onderzoek onmiddellijk beëindigd. Als het tweede dier blijft leven, wordt de dosis van 5 mg/kg aan ten hoogste nog eens drie dieren toegediend. Omdat er een hoog risico op sterfte zal zijn, moet de dosis met het oog op het welzijn van dieren achtereenvolgens aan telkens één dier worden toegediend. Vóór de toediening aan het volgende dier moet lang genoeg worden gewacht om vast te kunnen stellen dat het vorige dier waarschijnlijk zal blijven leven. Als er een tweede dier sterft, wordt de toediening onmiddellijk gestaakt en worden er geen dieren meer gebruikt. Een tweede dier dat sterft, levert (ongeacht het aantal dieren dat bij beëindiging is getest) het resultaat A op

(2 of meer dode dieren), zodat de indelingsregel van bijlage 2 bij de vaste dosis van 5 mg/kg wordt gevolgd (categorie 1 als er 2 of meer dode dieren zijn en categorie 2 als er niet meer dan één dood dier is). Daarnaast geeft bijlage 4 een leidraad voor de indeling in het EU-systeem totdat het nieuwe GHS ingevoerd is.

1.5.3 Hoofdonderzoek

1.5.3.1 Aantal dieren en dosisniveaus

Het stroomschema in bijlage 2 geeft aan wat er na de test op het aanvangsniveau moet gebeuren. Er zijn drie mogelijkheden : de test wordt gestaakt en de desbetreffende gevaar-indelingscategorie wordt toegekend, de test wordt bij een hogere vaste dosis voortgezet of de test wordt bij een lagere vaste dosis voortgezet. Met het oog op de bescherming van dieren wordt een dosisniveau dat bij de verkennende test een dood dier opleverde, bij het hoofdonderzoek niet opnieuw getest (zie bijlage 2). De ervaring heeft geleerd dat het meest waarschijnlijke resultaat bij de aanvangsdosis is dat de stof kan worden ingedeeld en dat er geen verdere tests nodig zijn.

Normaal gesproken worden er voor elk dosisniveau in totaal vijf dieren van hetzelfde geslacht gebruikt, namelijk het dier dat deze dosis bij de verkennende test toegediend heeft gekregen en nog eens vier dieren (behalve wanneer bij wijze van uitzondering een dosisniveau van het hoofdonderzoek niet in de verkennende test was opgenomen).

Het tijdsverloop tussen de toediening op elk niveau wordt bepaald door de aanvang, de duur en de ernst van de toxiciteitsverschijnselen. Met de toediening van een volgende dosis wordt gewacht totdat men er zeker van is dat de eerder geteste dieren blijven leven. Indien nodig wordt een periode van drie of vier dagen tussen de toediening op elk dosisniveau aanbevolen om observatie van vertraagde toxiciteit mogelijk te maken. Dit interval kan indien gewenst worden aangepast, bijvoorbeeld bij een onduidelijke reactie.

Wanneer het gebruik van een hoogste vaste dosis van 5 000 mg/kg wordt overwogen, moet de procedure van bijlage 3 worden gevolgd (zie ook punt 1.6.2).

1.5.3.2 Limiettest

De limiettest wordt voornamelijk uitgevoerd wanneer er informatie is die erop wijst dat het testmateriaal waarschijnlijk niet toxisch is c.q. alleen toxisch is in hogere doses dan de limieten in de regelgeving. Informatie over de toxiciteit van het testmateriaal kan afkomstig zijn van kennis omtrent vergelijkbare geteste verbindingen of vergelijkbare geteste mengsels of producten, waarbij rekening wordt gehouden met de identiteit en het percentage van de bestanddelen waarvan bekend is dat ze in toxicologisch opzicht relevant zijn. Wanneer er weinig of geen informatie over de toxiciteit van het testmateriaal is of wordt verwacht dat het toxisch is, moet het hoofdonderzoek worden uitgevoerd.

De limiettest voor deze testmethode wordt volgens de normale procedure uitgevoerd met een verkennende test met een aanvangsdosis van 2 000 mg/kg (of in uitzonderingsgevallen 5 000 mg/kg), gevolgd door de toediening van deze dosis aan nog eens vier dieren.

1.6 OBSERVATIE

De dieren worden gedurende de eerste 30 minuten na de toediening ten minste één maal elk afzonderlijk geobserveerd, gedurende de eerste 24 uur periodiek met bijzondere aandacht voor de eerste vier uur en vervolgens dagelijks gedurende in totaal 14 dagen, behalve wanneer ze met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek moeten worden genomen en op humane wijze moeten worden gedood of dood aangetroffen worden. De observatieduur is echter geen regel waarvan niet kan worden afgeweken. Deze moet worden bepaald aan de hand van de toxische reacties, het tijdstip waarop ze beginnen en de duur van de herstelperiode en kan dus worden verlengd indien dit nodig wordt geacht. Het is belangrijk op welk tijdstip de toxiciteitsverschijnselen verschijnen en verdwijnen, vooral als er een neiging is tot vertraagde toxiciteitsverschijnselen (11). Alle observaties worden systematisch geregistreerd en voor elk dier wordt een apart verslag bijgehouden.

Als de dieren toxiciteitsverschijnselen blijven vertonen, is aanvullende observatie nodig. Bij de observatie wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedragspatroon. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Er moet rekening worden gehouden met de beginselen en criteria in de leidraad voor humane eindpunten (8). Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben of blijvende tekenen van ernstig leed vertonen, worden op humane wijze gedood. Wanneer dieren op humane wijze worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

1.6.1 Lichaamsgewicht

Kort vóór de toediening van de teststof en vervolgens ten minste wekelijks wordt het gewicht van elk dier bepaald. De gewichtsverandering wordt berekend en geregistreerd. Aan het einde van de test worden de dieren die nog leven gewogen en vervolgens op humane wijze gedood.

1.6.2 Pathologie

Op alle proefdieren (ook degene die tijdens de test sterven of met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek worden genomen) wordt macroscopische obductie uitgevoerd. Alle macroscopische pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd. Microscopisch onderzoek van organen die tekenen van macroscopische pathologische veranderingen vertonen bij dieren die 24 uur of langer na de toediening nog leven, kan ook worden overwogen aangezien dit nuttige informatie kan opleveren.

2 GEGEVENS

Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast worden alle gegevens in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of op humane wijze is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen.

3 RAPPORTAGE

3.1 TESTVERSLAG

In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen :

Teststof :

- de fysische aard, de zuiverheid en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen (b.v. de isomeer-samenstelling);
- identificatiegegevens, zoals het CAS-nr.

Medium (indien van toepassing) :

- een motivering voor de keuze van het medium als een ander medium dan water wordt gebruikt.

Proefdieren :

- de gebruikte soort/stam;
- de microbiologische status van de dieren, indien deze bekend is; het aantal dieren, hun leeftijd en hun geslacht (indien van toepassing een motivering voor het gebruik van mannetjes in plaats van vrouwtjes);
- de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden :

- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof met bijzonderheden over de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof met vermelding van het toegediende volume en het toedieningstijdstip;
- gedetailleerde gegevens over het voer en het water (met vermelding van de aard/herkomst van het voer en de herkomst van het water);
- de motivering voor de keuze van de aanvangsdosis.

Resultaten :

- een tabel met gegevens over de respons en de dosis voor elk dier (b.v. dieren met toxiciteitsverschijnselen of sterfte en de aard, de hevigheid en de duur van de effecten);
- een tabel met het lichaamsgewicht en de veranderingen in het lichaamsgewicht;
- het gewicht van de dieren op de toedieningsdag, daarna een keer per week en tenslotte wanneer ze sterven of gedood worden;
- de datum en het tijdstip waarop de dieren sterven, als dit eerder gebeurt dan gepland;
- voor elk dier de aanvang en het verloop van de toxiciteitsverschijnselen en of ze reversibel waren;
- voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar.

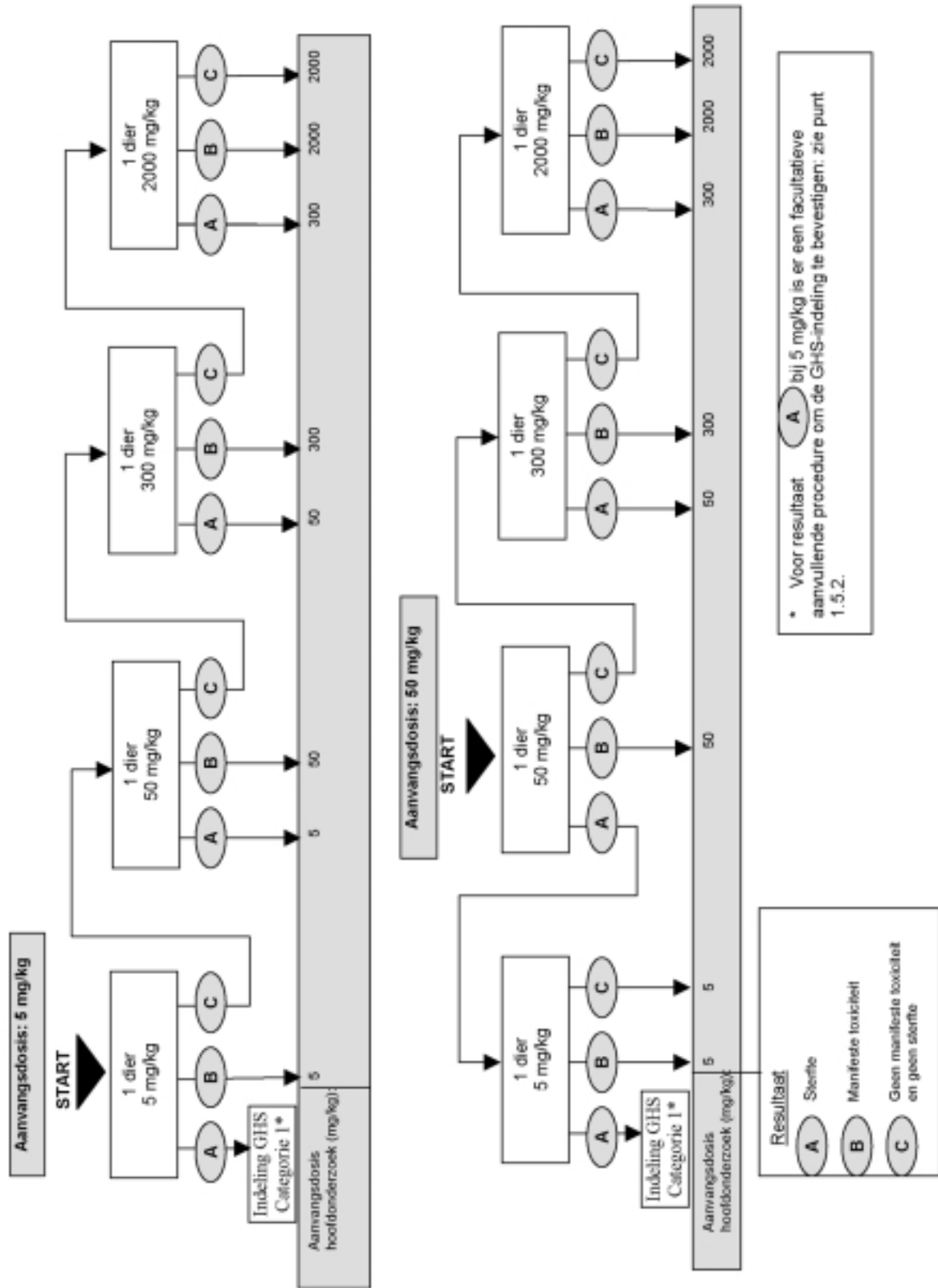
Bespreking en interpretatie van de resultaten.

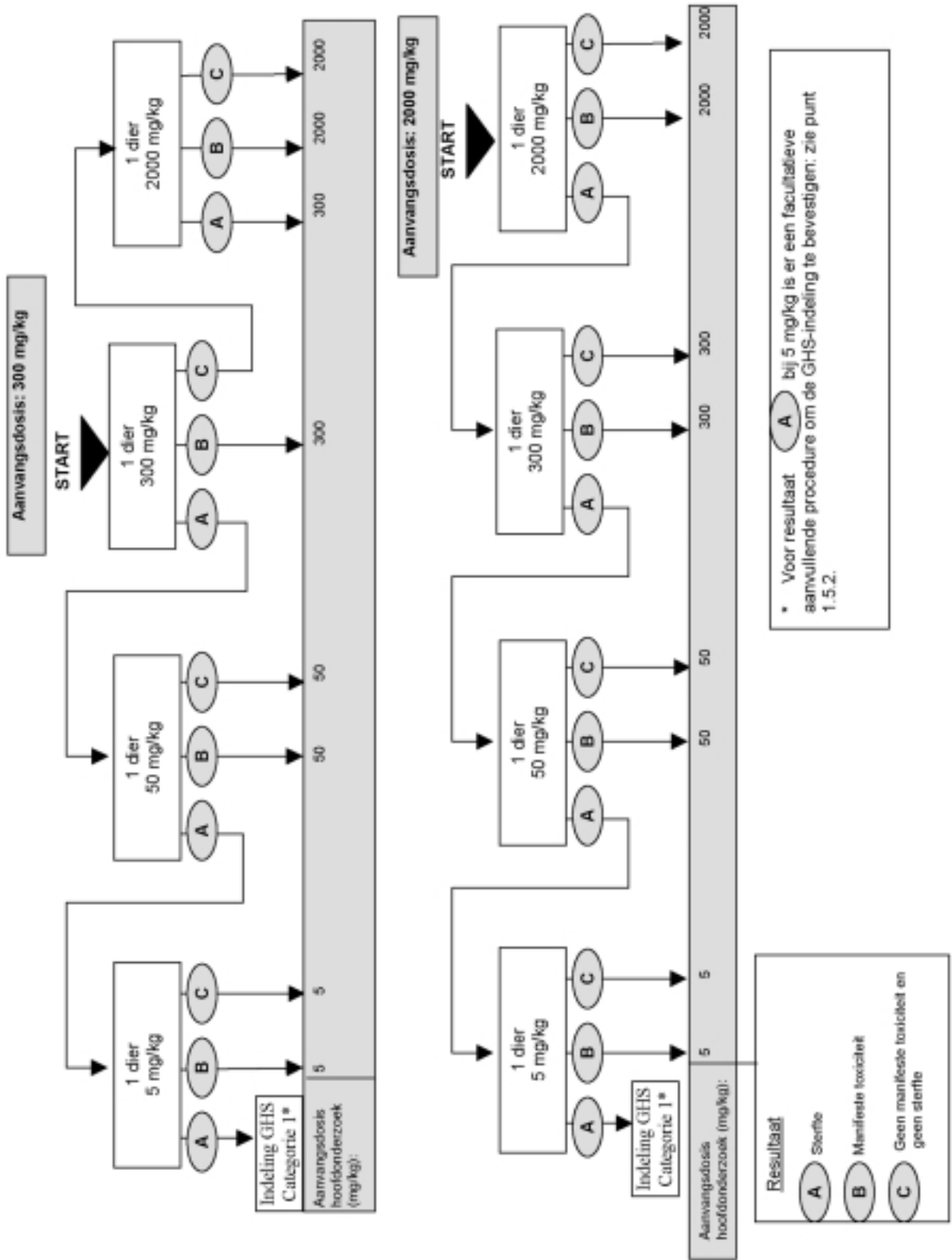
Conclusies

4 REFERENTIES

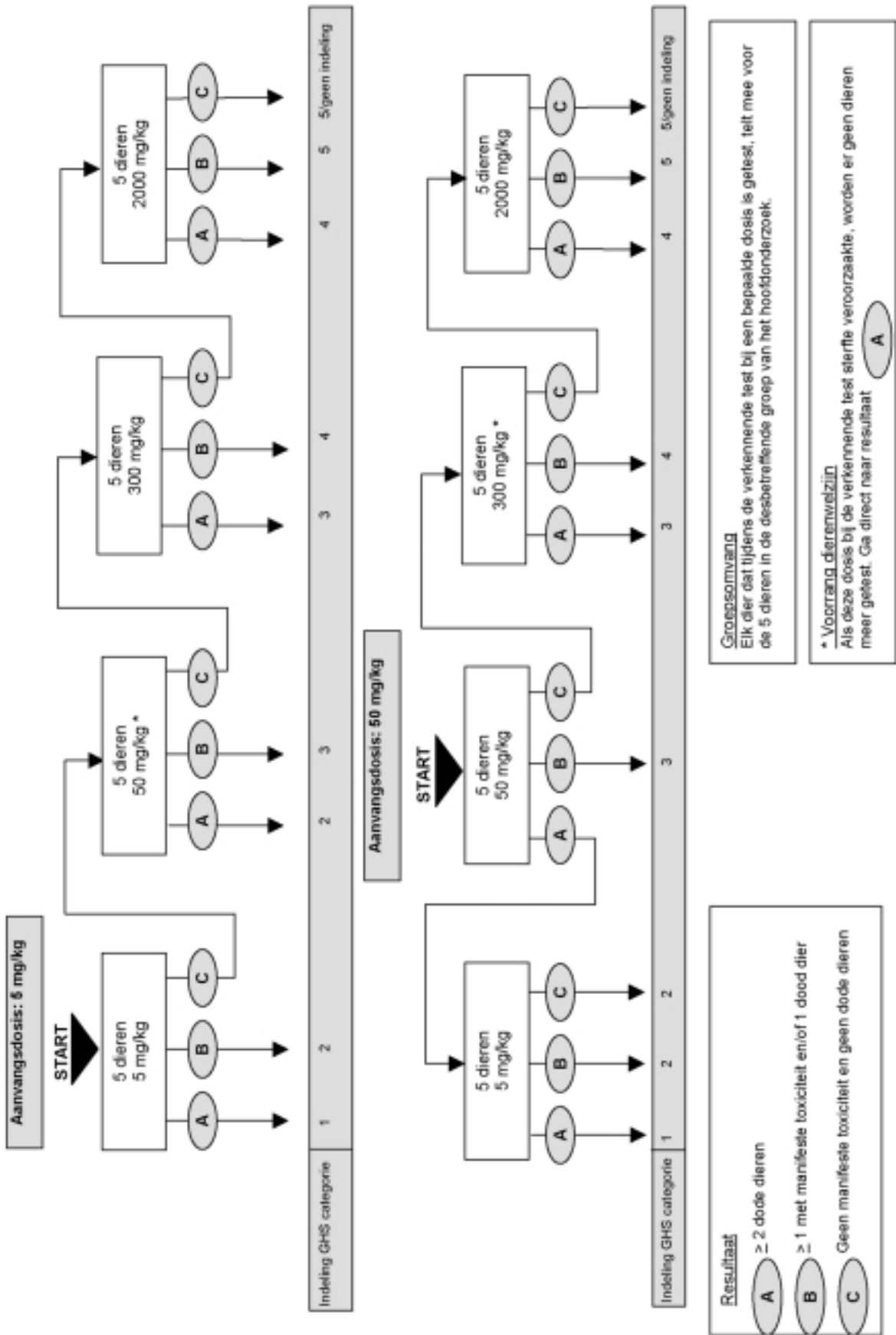
- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report : a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469-482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323. *Human Exptl. Toxicol.*
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183 -196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.
- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.
- (11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In : Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

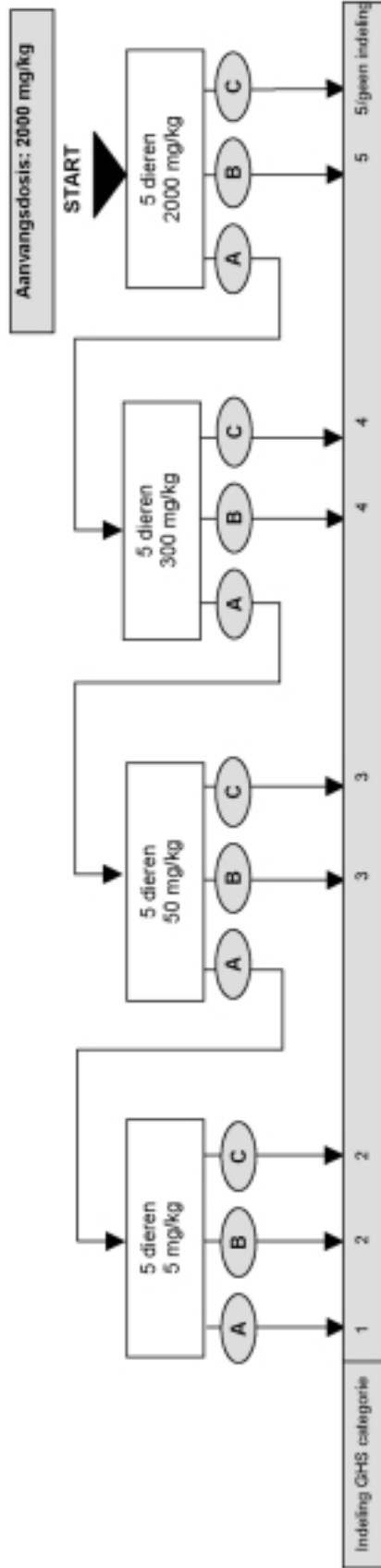
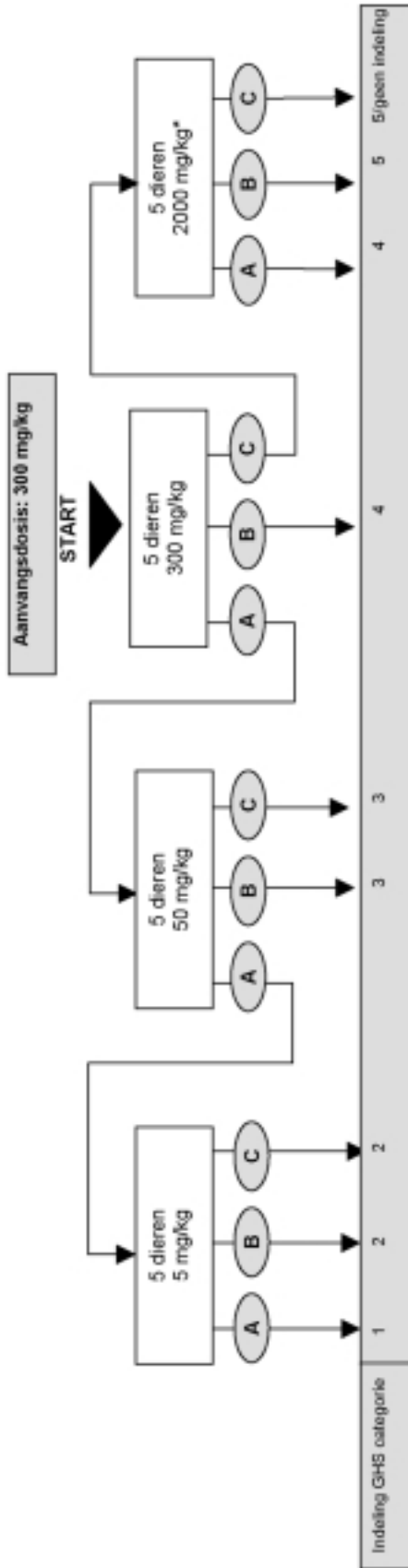
BIJLAGE 1: STROOMSCHEMA VOOR DE VERKENNENDE TEST





BIJLAGE 2: STROOMSCHEMA VOOR HET HOOFDONDERZOEK





Resultaat

A ≥ 2 dode dieren

B ≥ 1 met manifeste toxiciteit en/of 1 dood dier

C Geen manifeste toxiciteit en geen dode

Groepsomvang
Eik dier dat tijdens de verkennende test bij een bepaalde dosis is getest, telt mee voor de 5 dieren in de desbetreffende groep van het hoofdonderzoek.

* **Voortgang dieremwelzijn**
Als deze dosis bij de verkennende test sterfte veroorzaakte, worden er geen dieren meer getest. Ga direct naar resultaat A

Bijlage 3**CRITERIA VOOR DE INDELING VAN TESTSTOFFEN MET EEN VERWACHTE LD₅₀ DIE HOGER LIGT DAN 2 000 MG/KG ZONDER DAT ER TESTS BEHOEVEN TE WORDEN UITGEVOERD**

De criteria voor de gevarencategorie 5 zijn bedoeld om teststoffen te kunnen signaleren die een betrekkelijk geringe acute toxiciteit hebben, maar onder bepaalde omstandigheden een gevaar voor kwetsbare bevolkingsgroepen kunnen opleveren. Van deze stoffen wordt verwacht dat ze een orale of dermale LD₅₀ tussen 2 000 en 5 000 mg/kg hebben of een vergelijkbare toxiciteit voor andere routes. Deze teststoffen kunnen in de volgende gevallen in de gevarencategorie 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg worden ingedeeld (categorie 5 in het GHS) :

- a) als ze via een van de testschema's van bijlage 2 op basis van de sterftcijfers in deze categorie terechtkomen;
- b) als er al betrouwbaar bewijsmateriaal beschikbaar is waaruit blijkt dat de LD₅₀ binnen het interval van categorie 5 valt of als uit ander onderzoek bij dieren of toxische effecten bij de mens blijkt dat er sprake is van een risico voor de gezondheid van de mens van acute aard;
- c) via extrapolatie, raming of meting van gegevens als indeling in een gevaarlijkere categorie niet terecht is en
 - er betrouwbare informatie beschikbaar is die wijst op significante toxische effecten bij de mens of
 - bij tests tot waarden van categorie 4 langs orale weg sterfte wordt waargenomen of
 - wanneer het oordeel van deskundigen bevestigt dat er bij tests tot waarden voor categorie 4 significante klinische toxiciteitsverschijnselen zijn, met uitzondering van diarree, pilo-erectie of een onverzorgd uiterlijk of
 - wanneer het oordeel van deskundigen betrouwbare informatie bevestigt die op grond van andere dierproeven op mogelijke significante acute effecten wijst.

TESTEN BIJ DOSES VAN MEER DAN 2 000 MG/KG

Bij wijze van uitzondering kan alleen met een motivering op basis van specifieke regelgevingsvereisten daarnaast het gebruik van een hogere vaste dosis van 5 000 mg/kg worden overwogen. Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven bij 5 000 mg/kg niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die proeven van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van dieren of mensen (9).

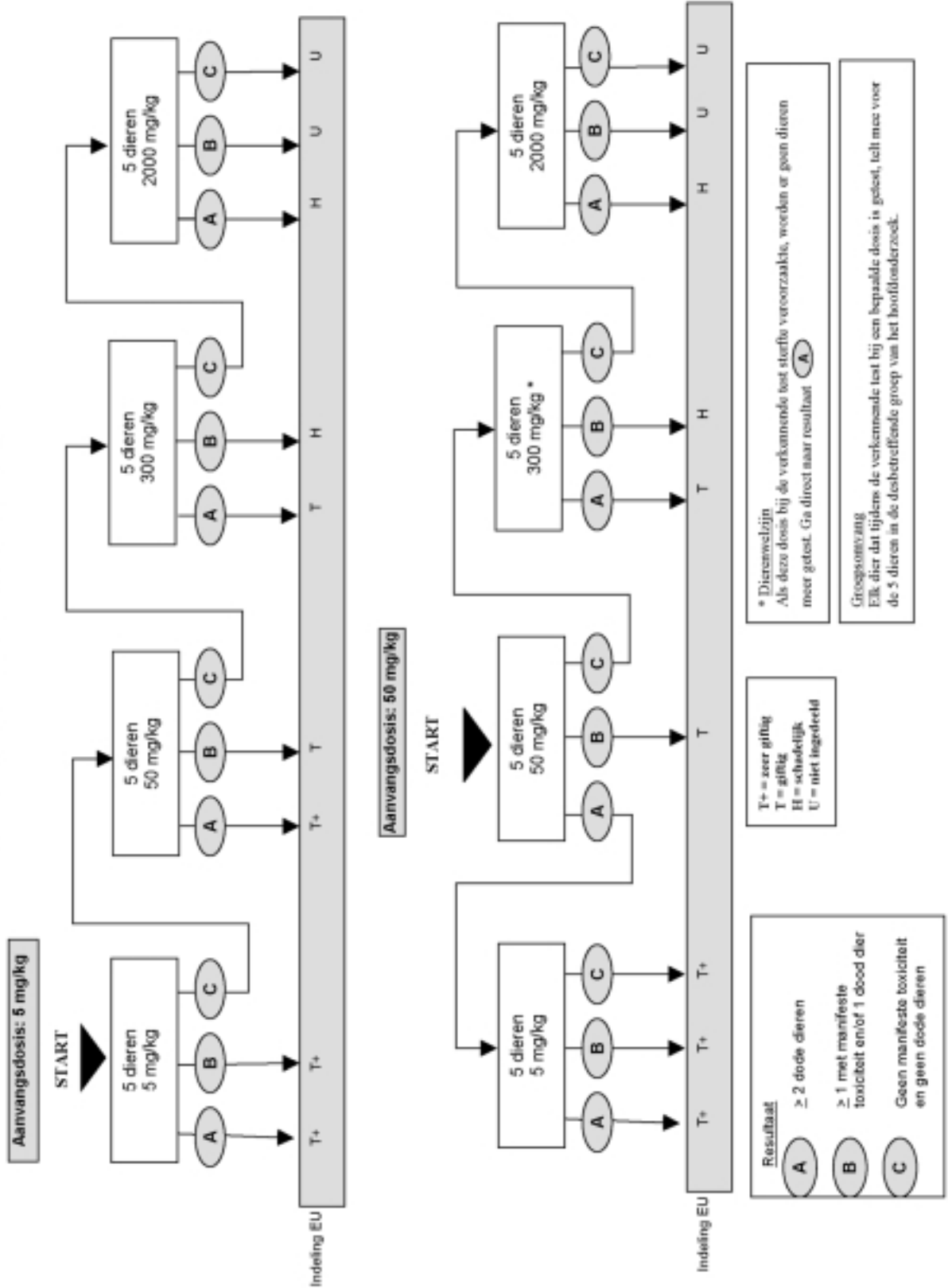
Verkennde test

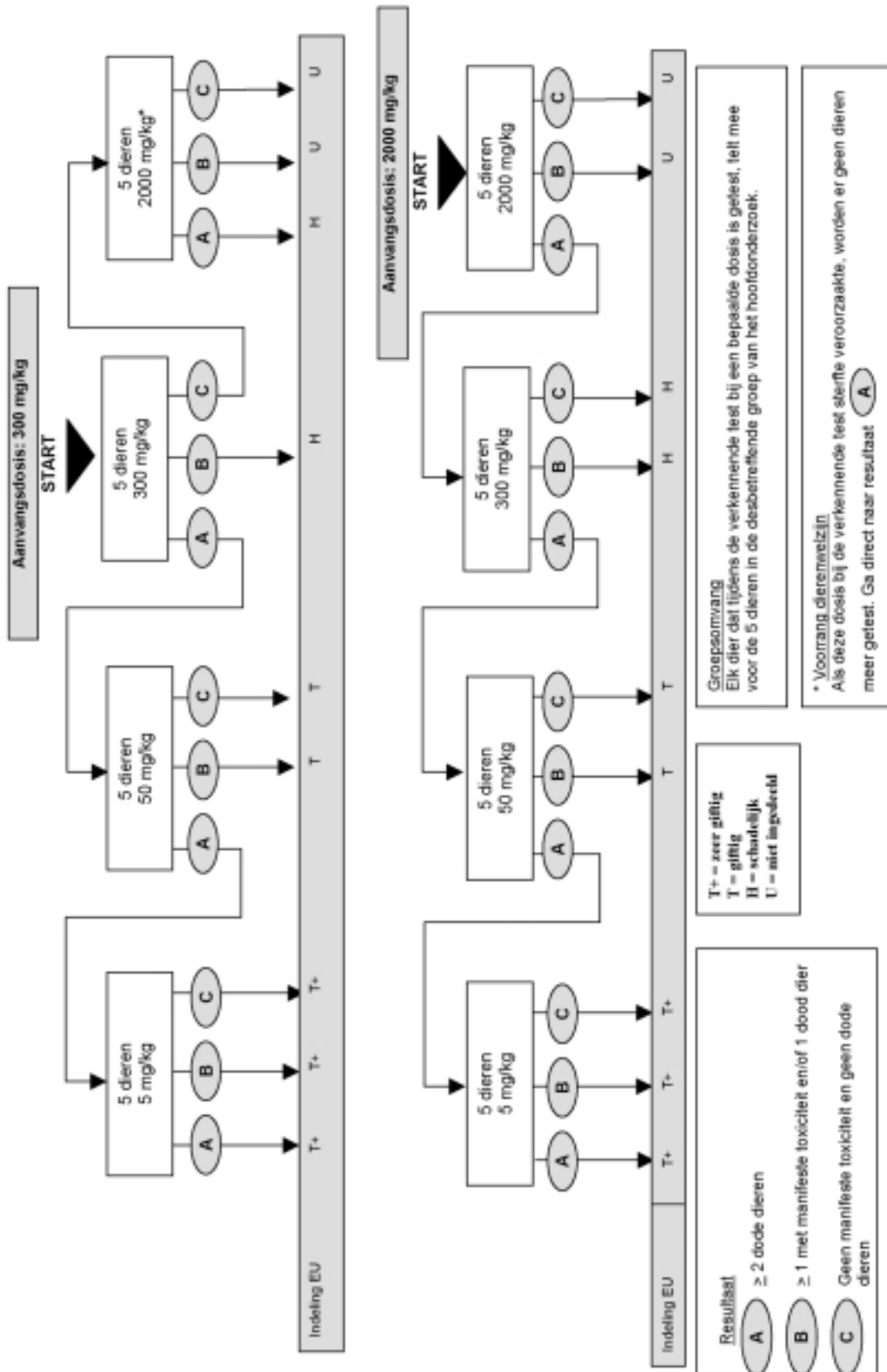
De beslissingsregels voor de sequentiële procedure van bijlage 1 worden uitgebreid met een dosis van 5 000 mg/kg. Dit betekent dat wanneer er bij een verkennde test een aanvangsdosis van 5 000 mg/kg wordt gebruikt die resultaat A (sterfte) oplevert, een tweede dier bij 2 000 mg/kg wordt getest; bij resultaat B of C (manifeste toxiciteit of geen toxiciteit) wordt 5 000 mg/kg als aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek gekozen. Als een andere aanvangsdosis dan 5 000 mg/kg wordt gebruikt, wordt de test bij resultaat B of C met 2 000 mg/kg voortgezet met 5 000 mg/kg; wanneer vervolgens 5 000 mg/kg resultaat A oplevert, wordt 2 000 mg/kg als aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek gekozen en bij resultaat B of C wordt 5 000 mg/kg als aanvangsdosis gekozen.

Hoofdonderzoek

De beslissingsregels voor de sequentiële procedure van bijlage 2 worden uitgebreid met een dosis van 5 000 mg/kg. Dit betekent dat wanneer er bij het hoofdonderzoek een aanvangsdosis van 5 000 mg/kg wordt gebruikt die resultaat A (≥ 2 dode dieren) oplevert, een tweede groep bij 2 000 mg/kg wordt getest; bij resultaat B (manifeste toxiciteit en/of ≤ 1 dood dier) of C (geen toxiciteit) wordt de stof niet volgens het GHS ingedeeld. Als een andere aanvangsdosis dan 5 000 mg/kg wordt gebruikt, wordt de test bij resultaat C met 2 000 mg/kg voortgezet met 5 000 mg/kg; wanneer vervolgens 5 000 mg/kg resultaat A oplevert, wordt de stof ingedeeld in categorie 5 van het GHS en bij resultaat B of C wordt de stof niet ingedeeld.

BIJLAGE 4:
TESTMETHODE B.1 bis – Leidraad voor de indeling in het EU-systeem gedurende de overgangperiode totdat het "Globally Harmonised Classification System" (GHS) volledig is ingevoerd (overgenomen uit referentie (8))





Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Bijlage 1 C

« B.1 TER. ACUTE ORALE TOXICITEIT : METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE

1 METHODE

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 423 (2001) van de OESO.

1.1 INLEIDING

De in deze test beschreven methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (1) is een stapsgewijze procedure waarbij voor iedere stap drie dieren van hetzelfde geslacht worden gebruikt. Afhankelijk van het aantal dode en/of stervende dieren kunnen er gemiddeld twee tot vier stappen nodig zijn om een uitspraak over de acute toxiciteit van de teststof te kunnen doen. Deze procedure is reproduceerbaar, gebruikt heel weinig dieren en kan stoffen op een vergelijkbare wijze rangschikken als de andere testmethoden voor acute toxiciteit. De methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse is gebaseerd op biometrische evaluaties (2) (3) (4) (5) met vaste doses, die ver genoeg uiteenliggen om een stof met het oog op de indeling en de bepaling van de gevaren te kunnen rangschikken. De in 1996 goedgekeurde methode is zowel op nationaal (6) als op internationaal (7) niveau uitgebreid *in vivo* gevalideerd in vergelijking met LD₅₀-gegevens uit de literatuur.

Richt snoeren voor de keuze van de meest geschikte testmethode voor een bepaald doel worden gegeven in de leidraad voor tests op acute orale toxiciteit (8). Deze leidraad bevat ook aanvullende informatie over de uitvoering en interpretatie van testmethode B.1 ter.

Teststoffen behoeven niet te worden toegediend in doses waarvan bekend is dat ze door een bijtende of sterk irriterende werking hevige pijn en leed veroorzaken. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, worden op humane wijze gedood en worden bij de interpretatie van de testresultaten op dezelfde manier behandeld als dieren die tijdens de test gestorven zijn. Er is een aparte leidraad met criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen (9).

Bij de methode worden vooraf bepaalde doses gebruikt en de resultaten maken het mogelijk de stof te rangschikken en in te delen aan de hand van het « Globally Harmonised System » voor de indeling van chemische stoffen die acute toxiciteit veroorzaken (10).

De methode is in principe niet bedoeld om de berekening van een exacte LD₅₀ mogelijk te maken, maar er kan wel een zeker blootstellingsinterval worden bepaald waar sterfte te verwachten valt, aangezien sterfte van een deel van de dieren het belangrijkste eindpunt van deze test blijft. Een LD₅₀ kan met deze methode alleen worden bepaald wanneer ten minste twee doses een sterfte tussen 0 % en 100 % opleveren. Het gebruik van een aantal vooraf bepaalde doses, ongeacht de teststof, waarbij de indeling expliciet wordt gekoppeld aan het aantal dieren waarbij uiteenlopende toestanden worden geobserveerd, biedt betere mogelijkheden voor consistentie en herhaalbaarheid bij rapportage door verschillende laboratoria.

Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Hierbij gaat het om informatie als de identiteit en de chemische structuur van de stof, de fysisch-chemische eigenschappen, het resultaat van andere met de stof uitgevoerde toxiciteitstests *in vivo* of *in vitro*, toxicologische gegevens over de qua structuur verwante stoffen en de voorgenomen toepassing(en) van de stof. Deze informatie is nodig om alle betrokkenen ervan te overtuigen dat de test relevant is voor de bescherming van de gezondheid van de mens en helpt tevens bij de keuze van de geschiktste aanvangsdosis.

1.2 DEFINITIES

Acute orale toxiciteit : de schadelijke effecten die zich voordoen na orale toediening van één dosis van een stof of verschillende doses die binnen 24 uur worden toegediend.

Vertraagde sterfte : houdt in dat een dier niet binnen 48 uur sterft of stervende is maar later gedurende de observatieperiode van 14 dagen sterft.

Dosis : de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bijvoorbeeld mg/kg).

GHS : het "Globally Harmonised Classification System" voor chemische stoffen en mengsels. Een samenwerkingsproject van de OESO (gezondheid van de mens en milieu), het Comité van deskundigen voor het vervoer van gevaarlijke goederen van de VN (fysisch-chemische eigenschappen) en de ILO (communicatie van gevaren) dat wordt gecoördineerd door het Gezamenlijk programma voor een verantwoord beheer van chemische stoffen (IOMC).

Ophanden zijnde sterfte : wanneer vóór het eerstvolgende geplande observatietijdstip een stervende toestand of sterfte wordt verwacht. Voorbeelden van indicaties voor deze toestand bij knaagdieren zijn convulsies, zijligging, liggende positie en tremors (zie de leidraad voor humane eindpunten (9) voor meer bijzonderheden).

LD₅₀ (mediaan van de orale letale dosis) : een statistisch afgeleide enkelvoudige dosis van een stof waarvan kan worden verwacht dat 50 % van de dieren waaraan deze dosis oraal wordt toegediend, sterft. De LD₅₀ wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (mg/kg).

Limietdosis : een dosis die bij tests als bovengrens wordt gehanteerd (2 000 of 5 000 mg/kg).

Stervende toestand : een toestand waarop de dood volgt of waarin overleven onmogelijk is, zelfs wanneer het dier wordt behandeld (zie de leidraad voor humane eindpunten (9) voor meer bijzonderheden).

Voorspelbare sterfte : een toestand met klinische verschijnselen die wijzen op sterfte op een bekend tijdstip in de toekomst vóór het geplande einde van het experiment, bijvoorbeeld wanneer het dier geen water of voer kan bereiken (zie de leidraad voor humane eindpunten (9) voor meer bijzonderheden).

1.3 PRINCIPE VAN DE TEST

Het principe van de test is dat op basis van een stapsgewijze procedure, waarbij per stap een zo klein mogelijk aantal dieren wordt gebruikt, voldoende informatie over de acute toxiciteit van de teststof wordt verkregen om deze in te kunnen delen. Een van de vaste doses van de stof wordt oraal aan een groep proefdieren toegediend. De stof wordt stapsgewijs getest en bij elke stap worden drie dieren van hetzelfde geslacht (normaal gesproken vrouwtjes) gebruikt. Het resultaat van de stap (dieren die ten gevolge van de toediening van de stof sterven of niet) is bepalend voor de volgende stap, namelijk :

- de test kan worden gestaakt,
- dezelfde dosis wordt aan nog eens drie dieren toegediend of
- de eerstvolgende hogere of lagere dosis wordt aan drie andere dieren toegediend.

Bijlage 1 bevat een gedetailleerde beschrijving van de testprocedure. Met deze methode kan een uitspraak worden gedaan over de indeling van de teststof in een van de toxiciteitsklassen die elk worden begrensd door vaste LD₅₀-waarden.

1.4 BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.4.1 Keuze van de diersoort

Bij voorkeur wordt de rat gebruikt, maar ook andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt. Normaal gesproken worden vrouwtjes gebruikt (9), omdat uit literatuuronderzoek van klassieke LD₅₀-tests blijkt dat er weliswaar meestal weinig verschil in gevoeligheid tussen mannetjes en vrouwtjes is, maar dat vrouwtjes meestal iets gevoeliger zijn wanneer er verschillen worden geconstateerd (11). Als echter uit kennis omtrent de toxicologische of toxicokinetische eigenschappen van qua structuur verwante chemische stoffen blijkt dat mannetjes waarschijnlijk gevoeliger zullen zijn, moeten mannetjes worden gebruikt. Wanneer de test bij mannetjes wordt uitgevoerd, moet hiervoor een afdoende motivering worden gegeven.

Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Elk dier moet bij de eerste toediening 8 tot 12 weken oud zijn en het lichaamsgewicht mag niet meer dan $\pm 20\%$ afwijken van het gemiddelde gewicht van dieren waaraan al eerder een dosis is toegediend.

1.4.2 Huisvesting en voeding

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbepaalde hoeveelheid drinkwater. De dieren mogen per dosis in groepen worden gehuisvest, maar het aantal dieren per kooi mag niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord.

1.4.3 Voorbereiding van de dieren

De dieren worden aseptic ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en vóór de toediening gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

1.4.4 Bereiding van de dosis

In het algemeen worden alle doses van de teststof in het hele testbereik in een constant volume toegediend door de concentratie van de toegediende dosis te variëren. Wanneer echter een vloeibaar eindproduct of mengsel wordt getest, kan het voor de latere risicobeoordeling van die stof zinvoller zijn de teststof onverdund, d.w.z. met een constante concentratie, te gebruiken en sommige regelgevende instanties hebben dit verplicht gesteld. Het maximaal toe te dienen volume mag echter in geen geval worden overschreden. Het is afhankelijk van de grootte van het proefdier welk volume vloeistof in één keer kan worden toegediend. Bij knaagdieren mag het volume normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden overwogen. Voor de formulering van de dosis wordt waar mogelijk het gebruik van een waterige oplossing/suspensie/emulsie aanbevolen, in volgorde van voorkeur gevolgd door een oplossing/suspensie/emulsie in olie (bijvoorbeeld maïsolie) en eventueel een oplossing in een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxicologische kenmerken van het medium bekend zijn. De dosis moet kort vóór de toediening worden bereid, tenzij de stabiliteit van het preparaat gedurende de gebruikperiode bekend is en is aangetoond dat deze aanvaardbaar is.

1.5 PROCEDURE

1.5.1 Toediening van de dosis

De teststof wordt in één dosis toegediend met een maagsonde of een geschikte katheter. In het uitzonderlijke geval dat één dosis niet mogelijk is, kan de dosis in kleinere porties worden verdeeld die in de loop van maximaal 24 uur worden toegediend.

De dieren moeten vóór de toediening vasten (ratten mogen bijvoorbeeld de nacht vóór de toediening geen voer maar wel water krijgen en muizen gedurende 3-4 uur). Na de vastperiode worden de dieren gewogen en wordt de teststof toegediend. Na de toediening van de stof kan men ratten nog eens 3-4 uur en muizen nog eens 1-2 uur laten vasten. Wanneer een dosis in de loop van de tijd in porties wordt toegediend, kan het afhankelijk van de lengte van de periode nodig zijn de dieren voer en water te geven.

1.5.2 Aantal dieren en hoogte van de doses

Voor elke stap worden er drie dieren gebruikt. Een van de vier vaste doses 5, 50, 300 en 2 000 mg/kg lichaamsgewicht wordt als aanvangsdosis gekozen. Als aanvangsdosis wordt de dosis gekozen waarbij naar alle waarschijnlijkheid enkele dieren zullen sterven. In de stroomschema's van bijlage 1 wordt de procedure beschreven die bij elk van de aanvangsdoses moet worden gevolgd. Daarnaast bevat bijlage 4 een leidraad voor de indeling in het EU-systeem totdat het nieuwe GHS is ingevoerd.

Wanneer de beschikbare informatie erop wijst dat er bij de hoogste aanvangsdosis (2 000 mg/kg lichaamsgewicht) waarschijnlijk geen dieren zullen sterven, moet er een limiettest worden uitgevoerd. Wanneer er geen informatie over een te testen stof is, wordt met het oog op het welzijn van dieren aanbevolen 300 mg/kg lichaamsgewicht als aanvangsdosis te gebruiken.

Het tijdsverloop tussen de toediening aan de verschillende groepen wordt bepaald door de aanvang, de duur en de ernst van de toxiciteitsverschijnselen. Met de toediening van een volgende dosis moet worden gewacht totdat men er zeker van is dat de eerder geteste dieren blijven leven.

Bij wijze van uitzondering kan alleen met een motivering op basis van specifieke regelgevingsvereisten daarnaast het gebruik van een hogere vaste dosis van 5 000 mg/kg lichaamsgewicht worden overwogen (zie bijlage 2). Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven in GHS-categorie 5 (2 000-5 000 mg/kg) niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die test van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van mens of dier of het milieu.

1.5.3 Limiettest

De limiettest wordt voornamelijk uitgevoerd wanneer er informatie is die erop wijst dat het testmateriaal waarschijnlijk niet toxisch is c.q. alleen toxisch is in hogere doses dan de limieten in de regelgeving. Informatie over de toxiciteit van het testmateriaal kan afkomstig zijn van kennis omtrent vergelijkbare geteste verbindingen of vergelijkbare geteste mengsels of producten, waarbij rekening wordt gehouden met de identiteit en het percentage van de bestanddelen waarvan bekend is dat ze in toxicologisch opzicht relevant zijn. Wanneer er weinig of geen informatie over de toxiciteit van het testmateriaal is of wordt verwacht dat het toxisch is, moet het hoofdonderzoek worden uitgevoerd.

Er kan een limiettest met één dosisniveau van 2 000 mg/kg worden uitgevoerd met zes dieren (drie dieren per stap). Bij wijze van uitzondering kan er een limiettest met één dosisniveau van 5 000 mg/kg worden uitgevoerd met drie dieren (zie bijlage 2). Als er dieren vanwege de toediening van de stof sterven, kan het nodig zijn de test bij de eerstvolgende lagere dosis voort te zetten.

1.6 OBSERVATIE

De dieren worden gedurende de eerste 30 minuten na de toediening ten minste één maal elk afzonderlijk geobserveerd, gedurende de eerste 24 uur periodiek met bijzondere aandacht voor de eerste vier uur en vervolgens dagelijks gedurende in totaal 14 dagen, behalve wanneer ze met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek moeten worden genomen en op humane wijze moeten worden gedood of dood aangetroffen worden. De observatieduur is echter geen regel waarvan niet kan worden afgeweken. Deze moet worden bepaald aan de hand van de toxische reacties, het tijdstip waarop ze beginnen en de duur van de herstelperiode en kan dus worden verlengd indien dit nodig wordt geacht. Het is belangrijk op welk tijdstip de toxiciteitsverschijnselen verschijnen en verdwijnen, vooral als er een neiging is tot vertraagde toxiciteitsverschijnselen (12). Alle observaties worden systematisch geregistreerd en voor elk dier wordt een apart verslag bijgehouden.

Als de dieren toxiciteitsverschijnselen blijven vertonen, is aanvullende observatie nodig. Bij de observatie wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedragspatroon. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Er moet rekening worden gehouden met de beginselen en criteria in de leidraad voor humane eindpunten (9). Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben of blijvende tekenen van ernstig leed vertonen, worden op humane wijze gedood. Wanneer dieren op humane wijze worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

1.6.1 Lichaamsgewicht

Kort vóór de toediening van de teststof en vervolgens ten minste wekelijks wordt het gewicht van elk dier bepaald. De gewichtsverandering wordt berekend en geregistreerd. Aan het einde van de test worden de dieren die nog leven gewogen en op humane wijze gedood.

1.6.2 Pathologie

Op alle proefdieren (ook degene die tijdens de test sterven of met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek worden genomen) wordt macroscopische obductie uitgevoerd. Alle macroscopische pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd. Microscopisch onderzoek van organen die tekenen van macroscopische pathologische veranderingen vertonen bij dieren die na 24 uur of langer nog leven, kan ook worden overwogen aangezien dit nuttige informatie kan opleveren.

2 GEGEVENS

Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast worden alle gegevens in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of op humane wijze is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen.

3 RAPPORTAGE

3.1 TESTVERSLAG

In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen :

Teststof :

- de fysische aard, de zuiverheid en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen (b.v. de isomeer-samenstelling);
- identificatiegegevens, zoals het CAS-nr.

Medium (indien van toepassing) :

- een motivering voor de keuze van het medium als een ander medium dan water wordt gebruikt.

Proefdieren :

- de gebruikte soort/stam;
- de microbiologische status van de dieren, indien deze bekend is;
- het aantal dieren, hun leeftijd en hun geslacht (indien van toepassing een motivering voor het gebruik van mannetjes in plaats van vrouwtjes);
- de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden :

- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof met bijzonderheden over de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof met vermelding van het toegediende volume en het toedieningstijdstip;
- gedetailleerde gegevens over het voer en het water (met vermelding van de aard/herkomst van het voer en de herkomst van het water);
- de motivering voor de keuze van de aanvangsdosis.

Resultaten :

- een tabel met gegevens over de respons en de dosis voor elk dier (b.v. dieren met toxiciteitsverschijnselen of sterfte en de aard, de hevigheid en de duur van de effecten);
- een tabel met het lichaamsgewicht en de veranderingen in het lichaamsgewicht;
- het gewicht van de dieren op de toedieningsdag, daarna een keer per week en tenslotte wanneer ze sterven of gedood worden;
- de datum en het tijdstip waarop de dieren sterven, als dit eerder gebeurt dan gepland;
- voor elk dier de aanvang en het verloop van de toxiciteitsverschijnselen en of ze reversibel waren;
- voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar.

Bespreking en interpretatie van de resultaten.

Conclusies**4 REFERENTIES**

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett.*, Suppl. 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559-610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods : Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, 129-134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I, Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA. »

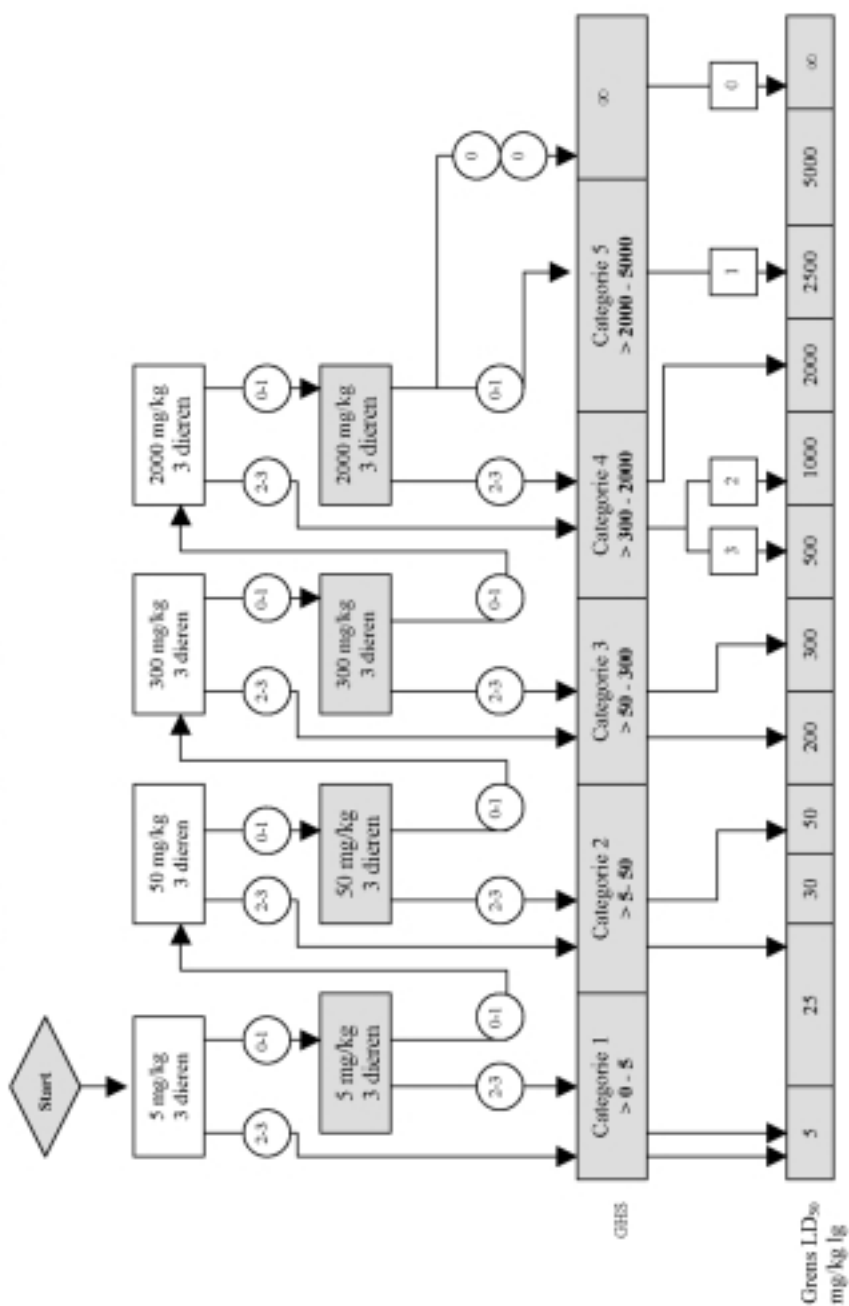
Bijlage 1**PROCEDURE VOOR ELKE AANVANGSDOSIS****ALGEMENE OPMERKINGEN**

In de stroomschema's in deze bijlage wordt voor elke aanvangsdosis de te volgen procedure geschetst :

- Bijlage 1 A : Aanvangsdosis 5 mg/kg lichaamsgewicht
- Bijlage 1 B : Aanvangsdosis 50 mg/kg lichaamsgewicht
- Bijlage 1 C : Aanvangsdosis 300 mg/kg lichaamsgewicht
- Bijlage 1 D : Aanvangsdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht

De pijlen geven, afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze gedode dieren, de te volgen procedure aan.

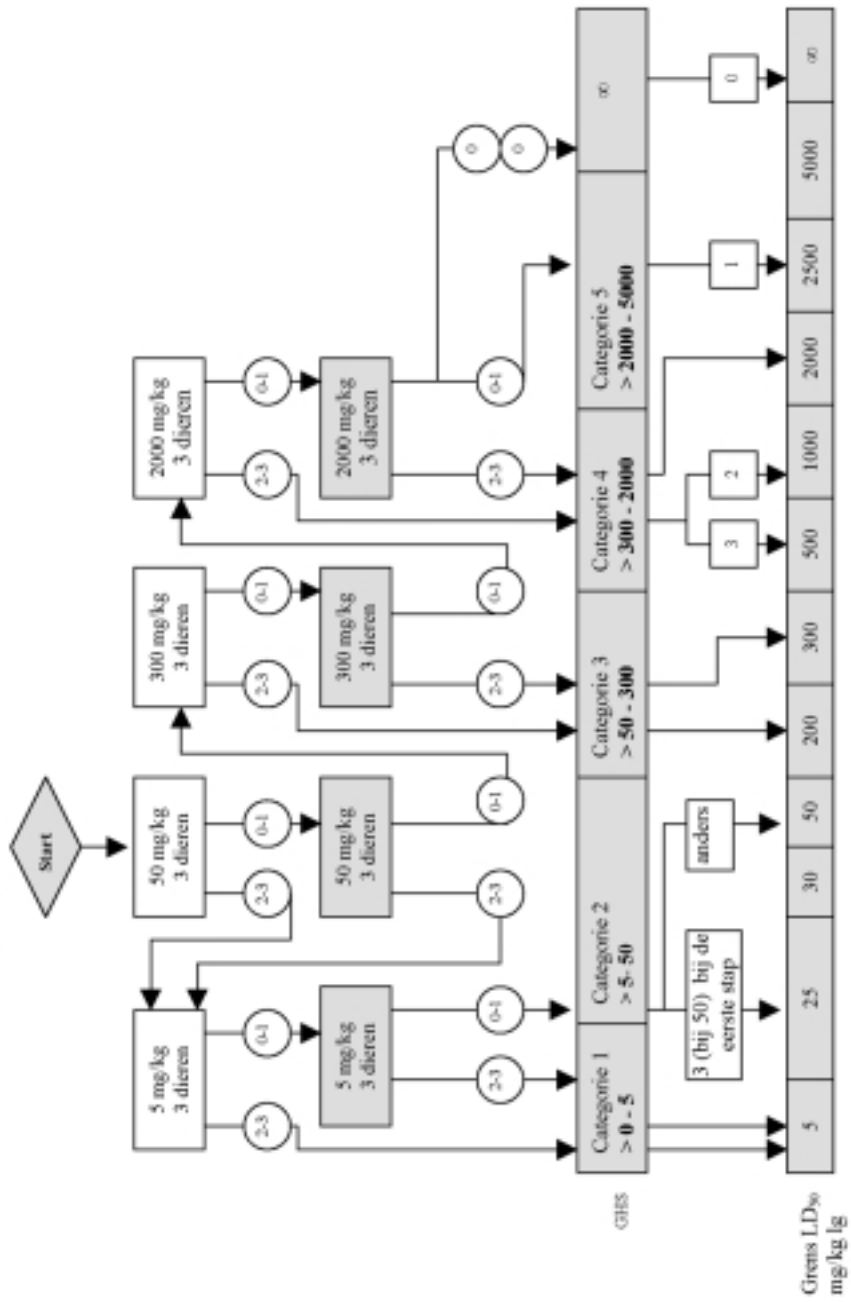
BIJLAGE 1 A
TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 5 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
- 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

- ∞ : niet ingedeeld
- - : testen bij 5000 mg/kg lg; zie bijlage 2

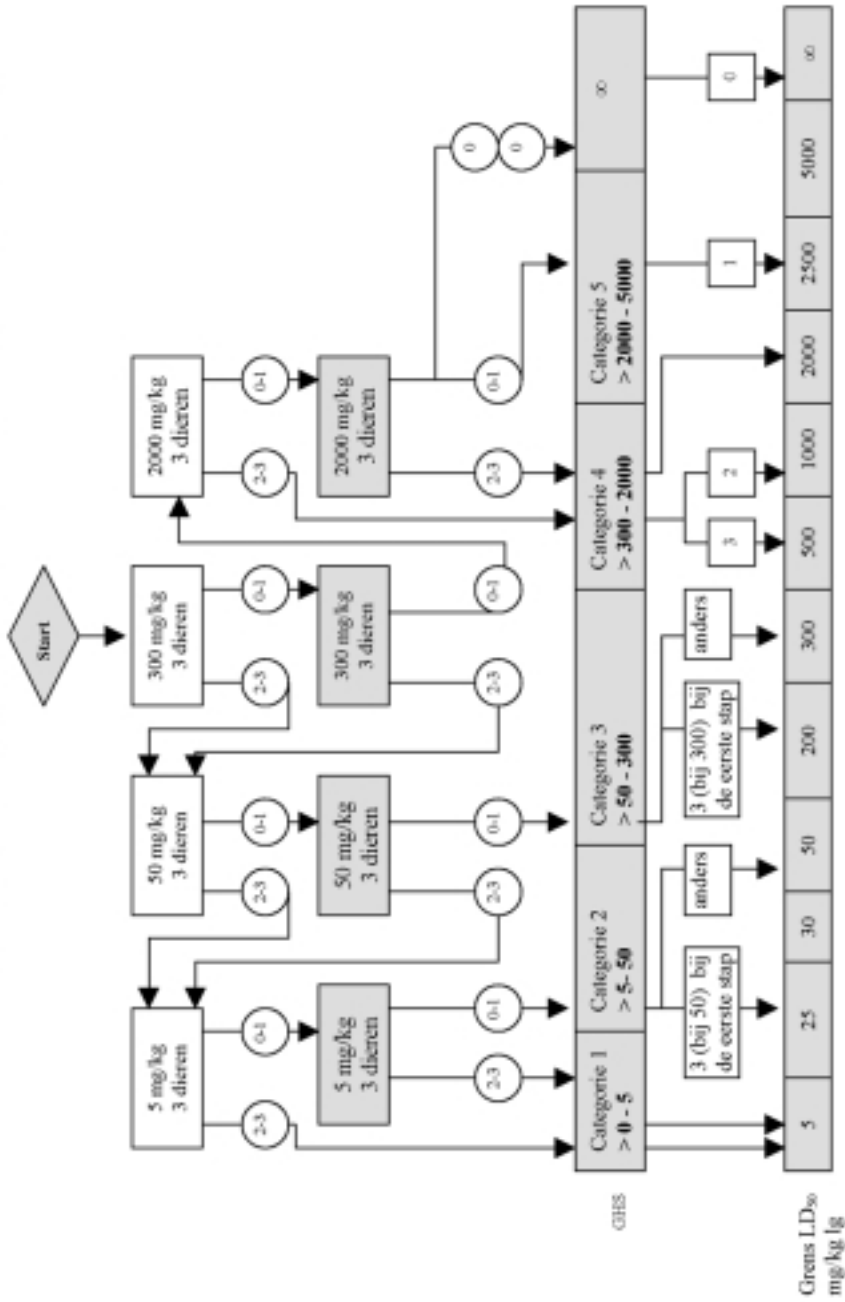
BILLAGI 1 B
 TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 50 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
- 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

- ∞ : niet ingedeeld
- - testen bij 5000 mg/kg lg: zie bijlage 2

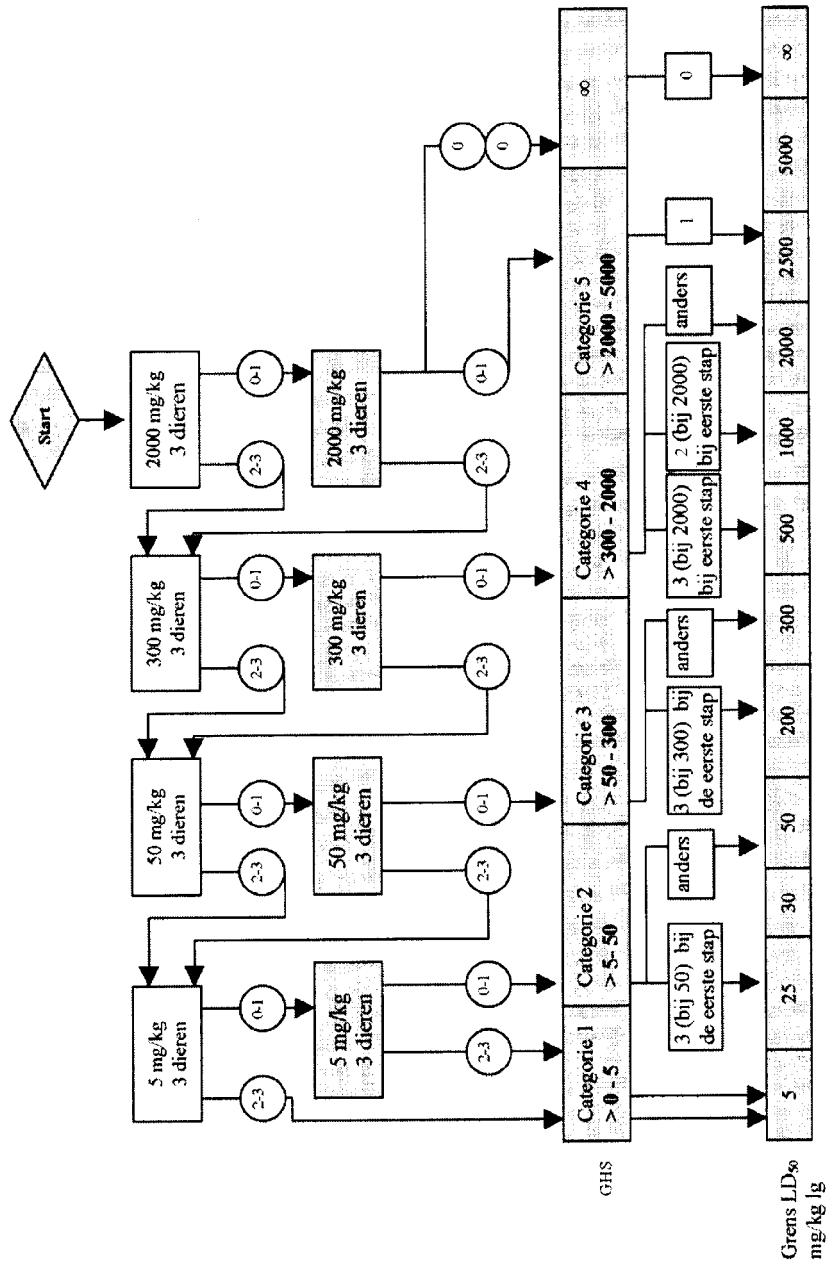
BIJLAGE 1 C
TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 300 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
- 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

- ∞ : niet ingedeeld
- testen bij 5000 mg/kg lg: zie bijlage 2

BIJLAGE 1 D
TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 2000 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
- 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

- ∞ : niet ingedeeld
- testen bij 5000 mg/kg lg: zie bijlage 2

Bijlage 2**CRITERIA VOOR DE INDELING VAN TESTSTOFFEN MET EEN VERWACHTE LD₅₀ DIE HOGER LIGT DAN 2 000 MG/KG ZONDER DAT ER TESTS BEHOEVEN TE WORDEN UITGEVOERD**

De criteria voor de gevarencategorie 5 zijn bedoeld om teststoffen te kunnen signaleren die een betrekkelijk geringe acute toxiciteit hebben, maar onder bepaalde omstandigheden een gevaar voor kwetsbare bevolkingsgroepen kunnen opleveren. Van deze stoffen wordt verwacht dat ze een orale of dermale LD₅₀ tussen 2 000 en 5 000 mg/kg hebben of een vergelijkbare toxiciteit voor andere routes. Deze teststoffen moeten in de volgende gevallen in de gevarencategorie 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg worden ingedeeld (categorie 5 in het GHS) :

a) als ze via een van de testschema's van bijlage 1A - 1D op basis van de sterftecijfers in deze categorie terecht komen;

b) als er al betrouwbaar bewijsmateriaal beschikbaar is waaruit blijkt dat de LD₅₀ binnen het interval van categorie 5 valt of als uit ander onderzoek bij dieren of toxische effecten bij de mens blijkt dat er sprake is van een risico voor de gezondheid van de mens van acute aard;

c) via extrapolatie, raming of meting van gegevens als indeling in een gevaarlijkere categorie niet terecht is en

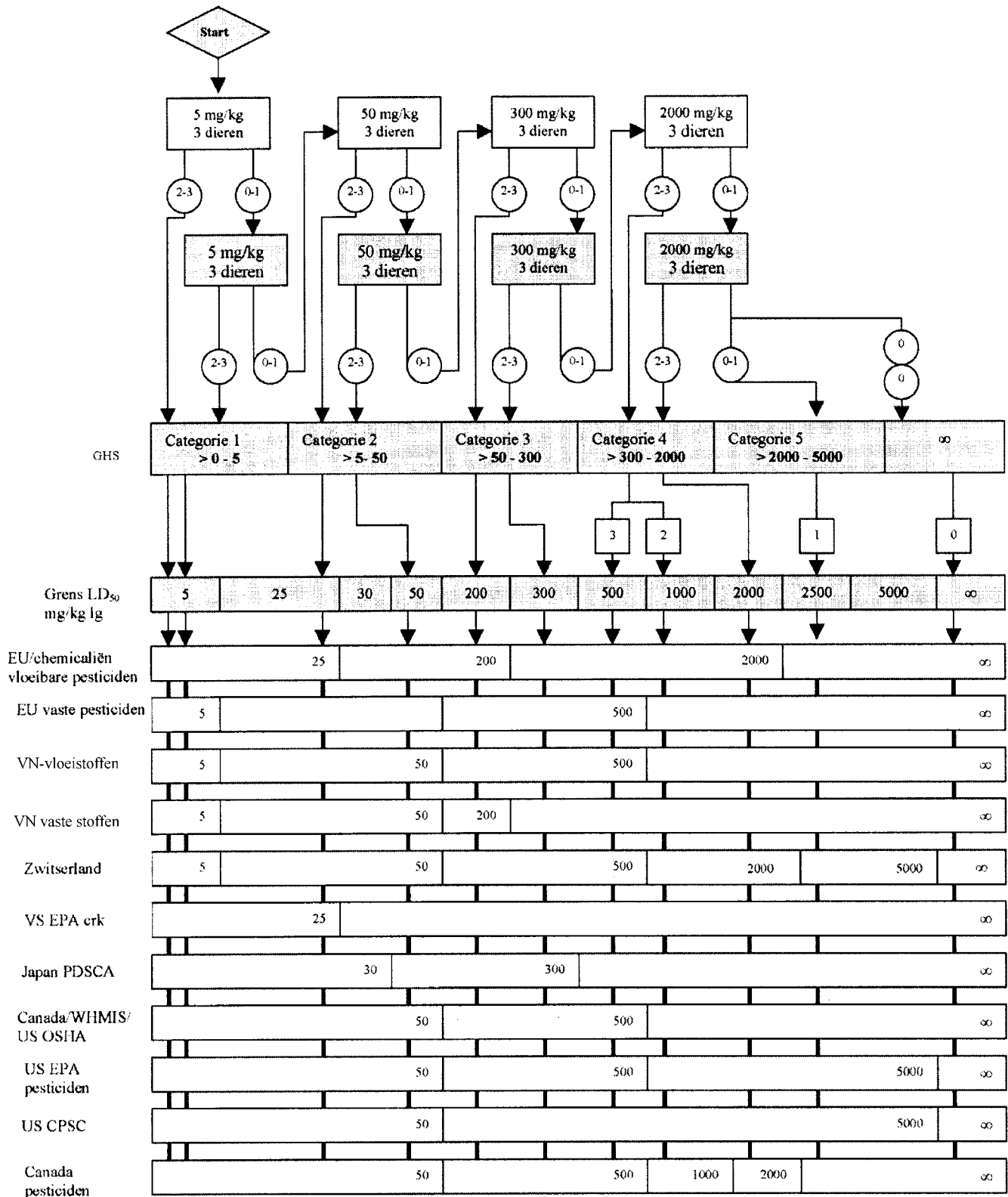
- er betrouwbare informatie beschikbaar is die wijst op significante toxische effecten bij de mens of
- bij tests tot waarden van categorie 4 langs orale weg sterfte wordt waargenomen of
- wanneer het oordeel van deskundigen bevestigt dat er bij tests tot waarden voor categorie 4 significante klinische toxiciteitsverschijnselen zijn, met uitzondering van diarree, pilo-erectie of een onverzorgd uiterlijk of
- wanneer het oordeel van deskundigen betrouwbare informatie bevestigt die op grond van andere dierproeven op mogelijke significante acute effecten wijst.

TESTEN BIJ DOSES VAN MEER DAN 2 000 MG/KG

Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven in categorie 5 (5 000 mg/kg) niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die test van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van mens of dier (10). Er dienen geen verdere tests bij hogere doses te worden uitgevoerd.

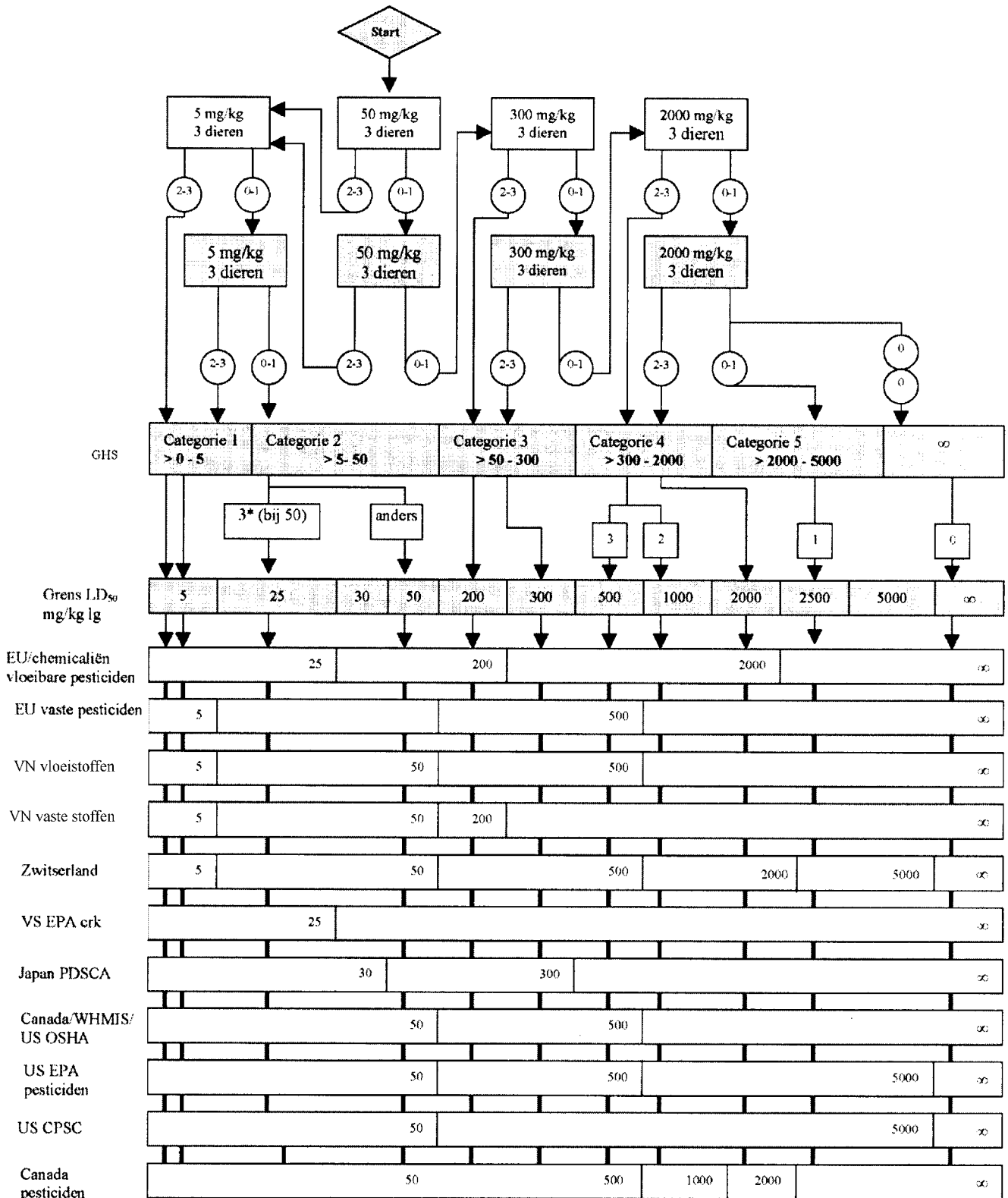
Wanneer testen met een dosis van 5 000 mg/kg nodig is, wordt er slechts één stap (d.w.z. drie dieren) uitgevoerd. Als het eerste dier na toediening sterft, gaat de toediening verder met 2 000 mg/kg volgens de stroomschema's van bijlage 1. Als het eerste dier blijft leven, wordt aan nog eens twee dieren 5 000 mg/kg toegediend. Als slechts één van de drie dieren sterft, wordt ervan uitgegaan dat de LD₅₀ hoger is dan 5 000 mg/kg. Als beide dieren sterven, gaat de toediening verder met 2 000 mg/kg.

BIJLAGE 3
TESTMETHODE B.1 ter: Leidraad voor de indeling in het EU-systeem gedurende de overgangperiode totdat het "Globally Harmonised Classification System" (GHS) volledig is ingevoerd (overgenomen uit referentie (8))



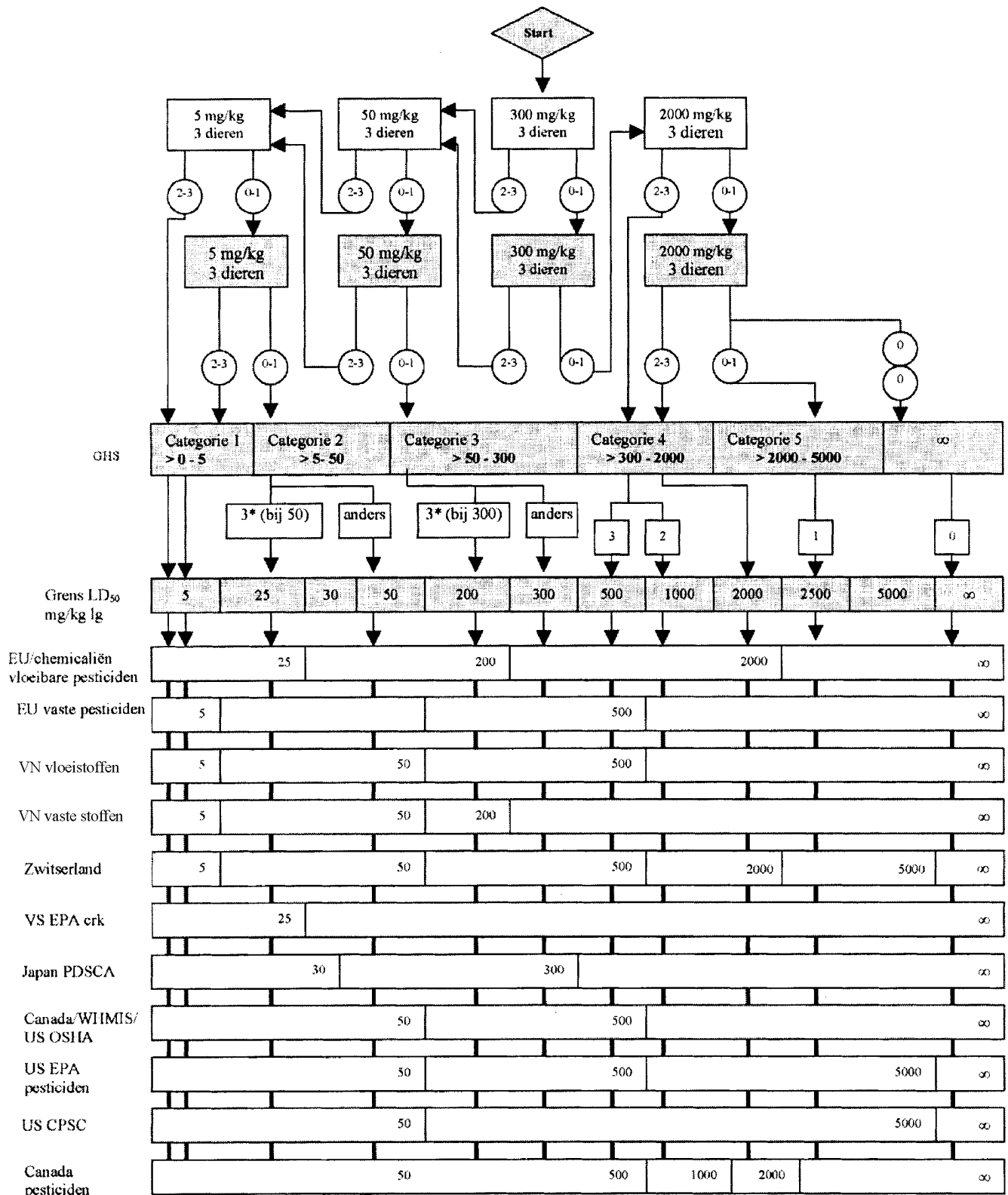
- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
 - 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap

- ∞ : niet ingedeeld
 - GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

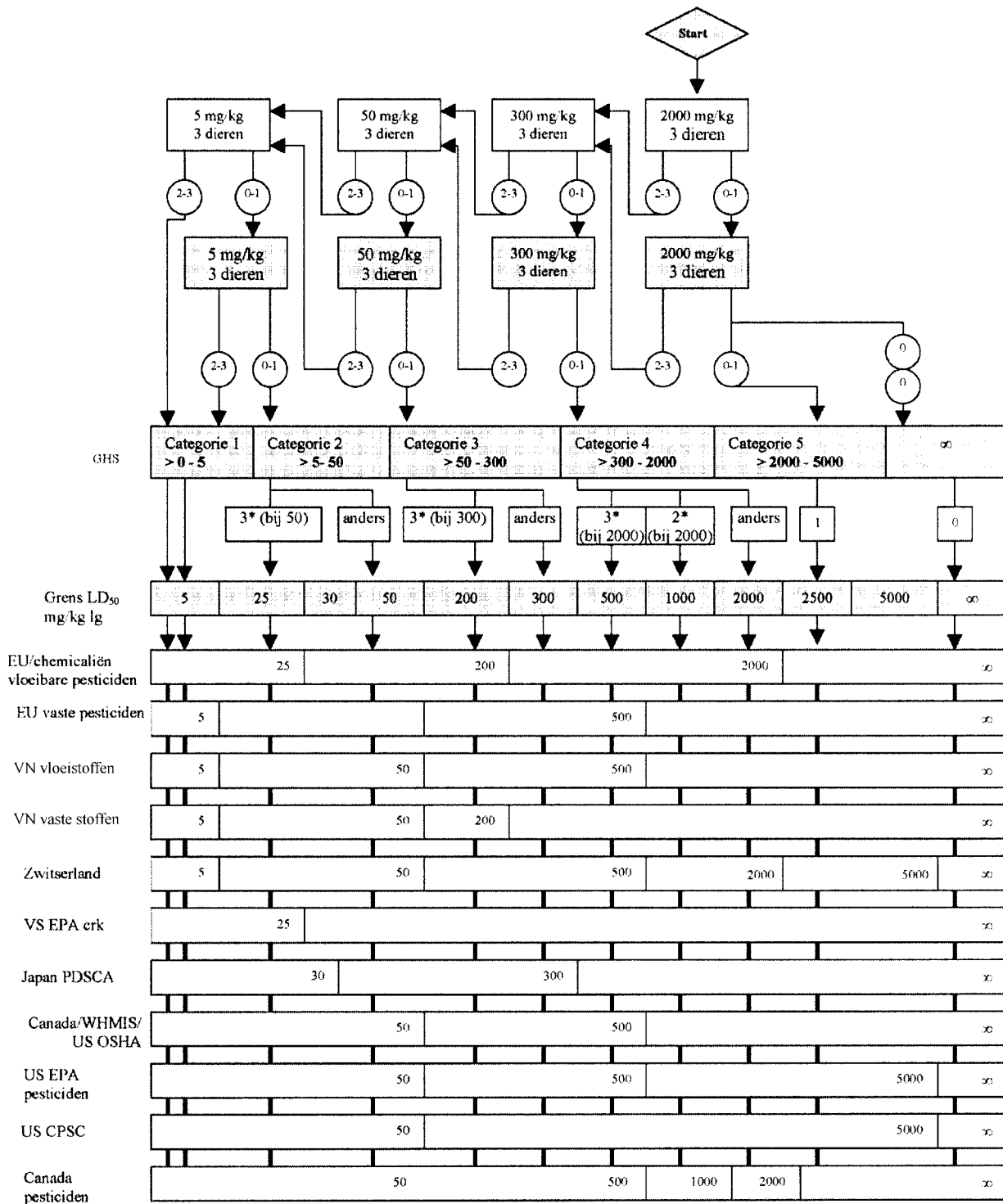


- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
 - 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap

- ∞ : niet ingedeeld
 - * : bij eerste stap
 - GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)



- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
- 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
- ∞ : niet ingedeeld
- * : bij eerste stap
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)



- per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
- 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
- ∞: niet ingedeeld
- *: bij eerste stap
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Bijlage 1 D

« B.4. ACUTE TOXICITEIT : HUIDIRRITATIE/CORROSIE

1 METHODE

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 404 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Bij de samenstelling van deze bijgewerkte methode is bijzondere aandacht besteed aan mogelijke verbeteringen met het oog op het welzijn van de dieren en aan de evaluatie van alle bestaande informatie over de teststof om onnodige tests bij proefdieren te vermijden. In deze methode wordt de aanbeveling opgenomen de bestaande relevante gegevens op bewijskracht te analyseren, alvorens de beschreven *in vivo* test op corrosie/irritatie van de stof wordt uitgevoerd. Wanneer er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn, kunnen ze worden aangevuld door een sequentiële teststrategie te volgen (1). De aanbevolen teststrategie omvat de uitvoering van gevalideerde en erkende *in vitro* tests en is als bijlage bij deze methode opgenomen. Bovendien wordt aanbevolen bij de voorlopige *in vivo* test de drie testgaasjes waar mogelijk niet tegelijkertijd maar achtereenvolgens aan te brengen.

In het belang van zowel wetenschappelijke kwaliteit als het dierenwelzijn moeten er geen *in vivo* tests worden uitgevoerd voordat alle beschikbare gegevens over de mogelijke huidcorrosie/irritatie door de stof zijn geëvalueerd op bewijskracht. Hierbij gaat het bijvoorbeeld om de resultaten van eerdere studies bij mensen en/of proefdieren, gegevens over corrosie/irritatie door een of meer qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen, gegevens waaruit blijkt dat de stof sterk zuur of sterk alkalisch is (2) (3), en resultaten van gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* tests (4) (5) (5a). Door een dergelijke analyse zijn er minder *in vivo* tests nodig op huidcorrosie/irritatie door stoffen waarvoor al voldoende bewijsmateriaal bestaat uit andere onderzoeken met deze twee eindpunten.

Een aanbevolen sequentiële teststrategie, waarin de uitvoering van gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* tests op corrosie/irritatie is opgenomen, is als bijlage bij deze methode opgenomen. De strategie is ontwikkeld tijdens een OESO-workshop (6), met algemene stemmen door de deelnemers aanbevolen en als aanbevolen teststrategie opgenomen in het "Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances" (GHS) (7). Hoewel deze sequentiële teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B.4 is, wordt aanbevolen deze teststrategie te volgen alvorens *in vivo* tests uit te voeren. Voor nieuwe stoffen is het de aanbevolen stapsgewijze testbenadering om wetenschappelijk verantwoorde gegevens over corrosie/irritatie door de stof te verkrijgen. Wanneer er voor bestaande stoffen onvoldoende gegevens over de huidcorrosie/irritatie beschikbaar zijn, moet de strategie worden gebruikt om ontbrekende gegevens aan te vullen. Voor het gebruik van een andere teststrategie of -procedure of de beslissing om geen stapsgewijze testbenadering te volgen moet een motivering worden gegeven.

Als bij een bewijskrachtanalyse niet kan worden geconcludeerd of er sprake is van corrosie of irritatie, moet overeenkomstig de sequentiële teststrategie een *in vivo* test worden overwogen (zie de bijlage).

1.2 DEFINITIES

Huidirritatie : het ontstaan van een omkeerbare beschadiging van de huid na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur.

Huidcorrosie : het ontstaan van een onomkeerbare beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur. Corrosie-reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloedkorsten en, tegen het eind van de observatieperiode van 14 dagen, ontkleuring door bleking van de huid, gebieden met volledige haaruitval en littekens. Voor de beoordeling van twijfelachtig letsel moet histopathologie worden overwogen.

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in één dosis op de huid van een proefdier aangebracht; de onbehandelde huid van het proefdier wordt als controle gebruikt. De mate van irritatie/corrosie wordt op bepaalde tijdstippen afgelezen en ingeschaald en wordt nader beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de studie moet voldoende zijn om te kunnen beoordelen of de waargenomen effecten reversibel of irreversibel van aard zijn.

Dieren die gedurende een fase van de test voortdurend tekenen van ernstig ongerief en/of hevige pijn vertonen, moeten op humane wijze worden gedood en de stof dient dienovereenkomstig te worden beoordeeld. Voor criteria voor de beslissing om stervende en hevig lijdende dieren op humane wijze te doden wordt verwezen naar referentie (8).

1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 Voorbereiding van de *in vivo* test

1.4.1.1 Keuze van de diersoort

Als proefdier wordt de voorkeur gegeven aan het albino konijn en er worden gezonde jonge volwassen konijnen gebruikt. Wanneer er een andere soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

1.4.1.2 Voorbereiding van de dieren

Ongeveer 24 uur vóór de test wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de dieren door kort afknippen verwijderd. Er moet op worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd. Alleen dieren met een gezonde en gave huid mogen worden gebruikt.

Sommige konijnenstammen hebben plekken met dichte haargroei, die in bepaalde perioden van het jaar meer op de voorgrond treden. De test mag niet op deze plekken met dichte haargroei worden uitgevoerd.

1.4.1.3 Huisvesting en voeding

De dieren worden in aparte kooien gehuisvest. De temperatuur in de proefdierruimte dient 20 °C (\pm 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

1.4.2 Testprocedure

1.4.2.1 Het aanbrengen van de teststof

De teststof wordt aangebracht op een klein huidoppervlak (ongeveer 6 cm²) en de plek wordt bedekt met een gaasje dat met behulp van niet-irriterend plakband op zijn plaats wordt gehouden. Wanneer de stof niet direct kan worden aangebracht (bijvoorbeeld bij vloeistoffen of bepaalde pasta's), wordt de teststof eerst op het gaasje aangebracht en wordt dit daarna op de huid bevestigd. Het gaasje moet gedurende de blootstellingsperiode door middel van een geschikt semi-occlusief verband in licht contact met de huid blijven. Als de teststof op het gaasje wordt aangebracht, moet dit zodanig op de huid worden bevestigd dat er een goed contact en een uniforme verdeling van de stof op de huid is. Er moet tevens voor worden gezorgd dat het gaasje voor het dier onbereikbaar is en dat inslikken of inademen van de teststof onmogelijk is.

Vloeibare stoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. Bij een proef met vaste stoffen (die indien nodig eventueel kunnen worden verpoederd) moet de teststof met een zo klein mogelijke hoeveelheid water (of indien nodig een ander geschikt medium) worden bevochtigd om voor een goed contact met de huid te zorgen. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moet een eventuele invloed van het medium op de irritatie van de huid door de teststof minimaal zijn.

Aan het einde van de blootstellingsperiode, die normaal gesproken 4 uur bedraagt, moeten de resten van de teststof zo mogelijk met water of met een geschikt oplosmiddel worden verwijderd zonder de bestaande respons of de intacte epidermis te wijzigen.

1.4.2.2 Dosisniveau

Een dosis van 0,5 ml vloeistof of 0,5 g vaste stof of pasta wordt op het testgedeelte van de huid aangebracht.

1.4.2.3 Voorlopige test (in vivo test op huidirritatie/corrosie met één dier)

Het is zeer wenselijk dat de *in vivo* test in eerste instantie met één dier wordt uitgevoerd, vooral wanneer wordt vermoed dat de stof corrosie kan veroorzaken. Dit is in overeenstemming met de sequentiële teststrategie (zie bijlage 1).

Wanneer een stof op basis van een bewijskrachtanalyse als corrosief wordt beschouwd, zijn er geen verdere dierproeven nodig. Bij de meeste stoffen waarvan wordt vermoed dat ze corrosief zijn, zijn verdere *in vivo* tests normaal gesproken niet nodig. Wanneer aanvullende gegevens nodig worden geacht omdat het bewijsmateriaal onvoldoende is, kunnen echter met de volgende aanpak beperkte dierproeven worden uitgevoerd: Bij het dier worden achtereenvolgens maximaal drie testgaasjes aangebracht. Het eerste gaasje wordt na drie minuten verwijderd. Als er geen ernstige huidreactie wordt waargenomen, wordt een tweede gaasje aangebracht dat na een uur wordt verwijderd. Als de waarnemingen in deze fase erop wijzen dat het niet onmenselijk is de blootstelling tot vier uur te verlengen, wordt een derde gaasje aangebracht, dat na vier uur wordt verwijderd, en wordt de reactie ingeschaald.

Als er na een van de drie achtereenvolgende blootstellingen een corrosie-reactie wordt waargenomen, wordt de test onmiddellijk gestaakt. Als er na de verwijdering van het laatste gaasje geen corrosie-reactie wordt waargenomen, wordt het dier gedurende 14 dagen geobserveerd tenzij er vóór die tijd al corrosie ontstaat.

Wanneer er niet wordt verwacht dat de teststof corrosie veroorzaakt maar deze wel irriterend kan zijn, wordt er één gaasje gedurende vier uur op één dier aangebracht.

1.4.2.4 Bevestigende test (in vivo test op huidirritatie/corrosie met meer dieren)

Als er bij de voorlopige test geen corrosie-reactie wordt waargenomen, moet de irritatie of negatieve reactie worden bevestigd met nog eens twee dieren die elk gedurende vier uur aan één gaasje worden blootgesteld. Als er bij de voorlopige test irritatie wordt waargenomen, kan de bevestigende test op sequentiële wijze worden uitgevoerd of door nog eens twee dieren tegelijkertijd bloot te stellen. Wanneer in een uitzonderlijk geval de voorlopige test niet wordt uitgevoerd, kunnen twee of drie dieren met één gaasje worden behandeld dat na vier uur wordt verwijderd. Wanneer er twee dieren worden gebruikt die beide dezelfde reactie vertonen, is verder testen niet nodig. Als de reactie verschilt, wordt ook het derde dier getest. Er kunnen extra dieren nodig zijn om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties.

1.4.2.5 Observatieperiode

De duur van de observatieperiode moet voldoende zijn om volledig te kunnen beoordelen of de waargenomen effecten reversibel zijn. Het experiment moet echter worden beëindigd zodra het dier voortdurend tekenen van hevige pijn of ernstig ongerief vertoont. Om te bepalen of de effecten reversibel zijn, moeten de dieren maximaal 14 dagen na de verwijdering van de gaasjes worden geobserveerd. Als al vóór het verstrijken van de 14 dagen wordt geconstateerd dat de effecten reversibel zijn, wordt het experiment op dat moment beëindigd.

1.4.2.6 Klinische observatie en inschaling van de huidreacties

Alle dieren worden op tekenen van erytheem en oedeem onderzocht en de respons wordt 60 minuten en vervolgens 24, 48 en 72 uur na de verwijdering van het gaasje ingeschaald. Bij de voorlopige test bij één dier wordt de huid ook onmiddellijk na de verwijdering van het gaasje onderzocht. De huidreactie wordt in een van de categorieën in de tabel ingeschaald en geregistreerd. Als er sprake is van een beschadiging van de huid die na 72 uur niet als irritatie of corrosie kan worden geïdentificeerd, kan het nodig zijn de observatie tot dag 14 voort te zetten om te bepalen of de effecten reversibel zijn. Naast de observatie van irritatie worden ook alle lokale toxische effecten, zoals ontvetting van de huid, en alle systemische schadelijke effecten (zoals effecten op klinische toxiciteitsverschijnselen en het lichaamsgewicht) volledig beschreven en geregistreerd. Om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties moet histopathologisch onderzoek worden overwogen.

De inschaling van huidreacties is per definitie subjectief. Om harmonisatie bij de inschaling van huidreacties te bevorderen en ter ondersteuning van de testlaboratoria en de personen die bij het uitvoeren en het interpreteren van de observatie betrokken zijn, moet het personeel dat de observatie uitvoert afdoende zijn opgeleid in het gebruikte scoresysteem (zie de tabel). Een geïllustreerde leidraad voor de inschaling van huidirritatie en ander letsel kan nuttig zijn (9). De inschaling van de huidreacties moet blind gebeuren.

2 GEGEVENS

2.1 VERMELDING VAN DE RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek worden in het eindverslag in tabelvorm vermeld en hierin worden alle onder punt 3.1 vermelde gegevens opgenomen.

2.2 EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De scores voor de huidirritatie worden in samenhang met de aard en ernst van het letsel en de vraag of dit al dan niet reversibel is, beoordeeld. De individuele scores vormen geen absolute norm voor de irriterende eigenschappen van een materiaal, aangezien ook andere effecten van het testmateriaal worden beoordeeld. De individuele scores moeten veeleer als referentiewaarden worden beschouwd, die in combinatie met alle andere observaties tijdens het onderzoek moeten worden geëvalueerd.

Bij de beoordeling van de irritatie-reactie moet rekening worden gehouden met de reversibiliteit van het huidletsel. Wanneer reacties als haaruitval (beperkt gebied), hyperkeratose, hyperplasie en schilfering tot het einde van de observatieperiode van 14 dagen blijven bestaan, moet de teststof als irriterend worden beschouwd.

3 RAPPORTAGE

3.1 TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen :

Motivering voor *in vivo* test : bewijskrachtanalyse van reeds bestaande testgegevens, zoals de resultaten van een sequentiële teststrategie :

- een beschrijving van de relevante gegevens die van eerdere tests beschikbaar zijn;
- de gegevens die bij elke fase van de teststrategie verkregen zijn;
- een beschrijving van de uitgevoerde *in vitro* tests met een gedetailleerde beschrijving van de procedures en de resultaten die met test/referentiestoffen verkregen zijn;
- een bewijskrachtanalyse voor de uitvoering van het *in vivo* onderzoek.

Teststof :

- identificatiegegevens (b.v. het CAS-nr., de herkomst, de zuiverheid, bekende verontreinigingen en het chargennummer);
- de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (b.v. de pH, de vluchtigheid, de oplosbaarheid en de stabiliteit);
- bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte.

Medium :

- identificatiegegevens, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume;
- een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren :

- de gebruikte soort/stam en een motivering indien andere dieren dan het albino konijn worden gebruikt;
- het aantal dieren van elk geslacht;
- het gewicht van elk dier aan het begin en het eind van de test;
- de leeftijd aan het begin van het onderzoek;
- de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden :

- de techniek voor de voorbereiding van de plaats waarop het gaasje wordt aangebracht;
- een gedetailleerde beschrijving van het gebruikte verbandmateriaal en de verbandtechniek;
- gedetailleerde gegevens over het bereiden, het aanbrengen en het verwijderen van de teststof.

Resultaten :

- een tabel met de score van de irritatie/corrosie-reactie voor elk dier op elk observatietijdstip;
- beschrijvingen van alle waargenomen letsels;
- een beschrijving in woorden van de aard en de ernst van de waargenomen irritatie of corrosie met eventuele histopathologische bevindingen;
- een beschrijving van andere schadelijke lokale (bijvoorbeeld ontvetting van de huid) en systemische effecten naast de huidirritatie of -corrosie.

Bespreking van de resultaten.

4 REFERENTIES

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 - 429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483 - 524.
- (5a) Testmethode B.40 : Huidcorrosie.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme : Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[op verzoek verkrijgbaar bij het OESO-secretariaat].

TABEL I : INSCHALING VAN DE HUIDREACTIES**Vorming van erytheem en korsten**

Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

Maximale score : 4

Vorming van oedeem

Geen oedeem	0
Zeer licht oedeem (nauwelijks waarneembaar)	1
Licht oedeem (de randen van het gebied zijn goed zichtbaar door duidelijke zwelling)	2
Matig oedeem (ongeveer 1 mm zwelling)	3
Ernstig oedeem (meer dan 1 mm zwelling tot buiten het blootstellingsgebied)	4

Maximale score : 4

Om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties kan histopathologisch onderzoek worden uitgevoerd.

Bijlage

Een sequentiële teststrategie voor huidirritatie en -corrosie

ALGEMENE OVERWEGINGEN

Hoewel deze sequentiële teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B.4 is, vormt zij de aanbevolen aanpak voor de bepaling van de kenmerken qua huidirritatie/corrosie. Deze aanpak houdt zowel een optimale gedragscode als een ethische referentie voor *in vivo* tests op huidirritatie/corrosie in. De testmethode bevat een leidraad voor de uitvoering van de *in vivo* test en geeft een overzicht van de factoren die vóór het begin van een dergelijke test in aanmerking moeten worden genomen. De strategie levert een benadering voor de evaluatie van bestaande gegevens over de eigenschappen van teststoffen inzake huidirritatie/corrosie en een trapsgewijze aanpak voor het vergaren van relevante gegevens over stoffen waarvoor nader onderzoek nodig is of waarvoor nog geen onderzoek is uitgevoerd. Ook wordt aanbevolen onder bepaalde omstandigheden gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* tests op huidirritatie/corrosie uit te voeren.

In het belang van verantwoorde wetenschap en het welzijn van dieren is het belangrijk dat het onnodig gebruik van dieren wordt vermeden en dat tests waarvan hevige reacties bij dieren worden verwacht, tot een minimum worden beperkt. Alle informatie over een stof die relevant is voor de mogelijke huidirritatie/corrosie door die stof moet worden geëvalueerd voordat een *in vivo* test wordt overwogen. Wellicht bestaat er al voldoende bewijsmateriaal om een teststof qua mogelijke huidirritatie of -corrosie in te delen zonder dat er tests bij proefdieren behoeven te worden uitgevoerd. Daarom zal het gebruik van een bewijskrachtanalyse en een sequentiële teststrategie de noodzaak van *in vivo* tests tot een minimum beperken, vooral als er van de stof hevige reacties worden verwacht.

Het gebruik van een bewijskrachtanalyse voor de evaluatie van bestaande informatie over huidirritatie en -corrosie door stoffen wordt aanbevolen om te bepalen of ander aanvullend onderzoek dan *in vivo* huidonderzoek moet worden uitgevoerd om te helpen bij de bepaling van deze mogelijke effecten. Wanneer nader onderzoek nodig is, wordt aanbevolen de sequentiële teststrategie te gebruiken om de relevante experimentele gegevens te verkrijgen. Voor stoffen die nog niet zijn getest, moet de sequentiële teststrategie worden gebruikt om de gegevens te vergaren die nodig zijn om de mogelijke huidirritatie/corrosie te bepalen. De in deze bijlage beschreven teststrategie is tijdens een OESO-workshop (1) ontwikkeld en later bevestigd en opgenomen in het "Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances", die de steun heeft gekregen van de 28e gezamenlijke vergadering van het Comité chemische stoffen en de Werkgroep chemische stoffen in november 1998 (2).

BESCHRIJVING VAN DE EVALUATIE EN DE TESTSTRATEGIE

Alvorens te beginnen met tests als onderdeel van de sequentiële teststrategie (zie figuur), moet alle beschikbare informatie worden geëvalueerd om te bepalen of *in vivo* huidonderzoek nodig is. Hoewel de evaluatie van individuele parameters (bijvoorbeeld een extreme pH) significante informatie kan opleveren, moet rekening worden gehouden met alle bestaande informatie. Alle relevante gegevens over de effecten van de betrokken stof of analoge verbindingen moeten bij het nemen van een beslissing over de bewijskracht worden geëvalueerd en er moet een motivering voor de beslissing worden gegeven. De nadruk moet in eerste instantie liggen op bestaande gegevens over de effecten van de stof bij mens en dier en vervolgens op de resultaten van *in vitro* of *ex vivo* tests. Waar mogelijk moet *in vivo* onderzoek aan corrosieve stoffen worden vermeden. Bij de teststrategie spelen de volgende factoren een rol :

Evaluatie van bestaande gegevens over de effecten bij mens en dier (stap 1). In de eerste plaats moet worden gekeken naar bestaande gegevens over de effecten bij de mens, zoals klinisch of bedrijfsgeneeskundig onderzoek en ziektegevallen, en/of gegevens van dierproeven, bijvoorbeeld van onderzoek naar huidtoxiciteit bij eenmalige of herhaalde blootstelling, omdat deze informatie opleveren die rechtstreeks verband houdt met huideffecten. Bij stoffen waarvan bekend is dat ze irritatie of corrosie veroorzaken en stoffen waarvoor duidelijk is aangetoond dat dit niet het geval is, behoeven geen *in vivo* tests te worden uitgevoerd.

Analyse van structuur/activiteit-relaties (SAR) (stap 2). Er moet worden gekeken naar de resultaten van tests met qua structuur verwante stoffen, indien deze beschikbaar zijn. Wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn over de effecten van qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen bij mens en/of dier om te kunnen concluderen dat deze huidcorrosie/irritatie kunnen veroorzaken, mag worden aangenomen dat de te evalueren teststof tot dezelfde reacties zal leiden. In dat geval behoeft de stof wellicht niet te worden getest. Negatieve gegevens van onderzoek met qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen vormen in het kader van de sequentiële teststrategie niet een afdoende bewijs dat de stof geen corrosie of irritatie veroorzaakt. Voor de bepaling van de potentie voor zowel huidcorrosie als -irritatie moeten gevalideerde en erkende SAR-methoden worden gebruikt.

Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit (stap 3). Stoffen met een extreme pH van bijvoorbeeld $\leq 2,0$ en $\geq 11,5$ kunnen hevige lokale effecten hebben. Als een stof op basis van een extreme pH als corrosief voor de huid wordt aangeduid, kan ook rekening worden gehouden met zijn zuur/alkaliereserve (of buffercapaciteit) (3) (4). Als de buffercapaciteit erop wijst dat een stof wellicht *niet* corrosief voor de huid is, moeten er nadere tests worden uitgevoerd om dit te bevestigen, waarbij bij voorkeur een gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* test moet worden gebruikt (zie de stappen 5 en 6).

Huidtoxiciteit (stap 4). Als van een stof is aangetoond dat deze via de huid zeer toxisch is, is een *in vivo* onderzoek naar huidirritatie/corrosie wellicht niet uitvoerbaar, omdat de normaal gesproken gebruikte hoeveelheid teststof al groter kan zijn dan de zeer toxische dosis en derhalve tot gevolg kan hebben dat de dieren sterven of hevig lijden. Wanneer er al onderzoek naar de huidtoxiciteit bij albino konijnen tot de limietdosis van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht of meer is uitgevoerd en er geen huidirritatie of -corrosie is waargenomen, zijn verdere tests op huidirritatie/corrosie bovendien wellicht niet nodig. Bij de evaluatie van acute huidtoxiciteit bij eerder uitgevoerd onderzoek moet er op een aantal aspecten worden gelet. Zo kan de gerapporteerde informatie over huidletsel onvolledig zijn. De tests en observaties kunnen bij een andere soort dan het konijn zijn uitgevoerd en de gevoeligheid kan van soort tot soort sterk verschillen. Het is ook mogelijk dat de stof of de dieren is aangebracht in een vorm die niet geschikt is voor de beoordeling van huidirritatie/corrosie, bijvoorbeeld omdat de stof voor de test op huidtoxiciteit is verdund (5). Wanneer er echter goed opgezette en uitgevoerde onderzoeken op huidtoxiciteit bij konijnen zijn verricht, kunnen negatieve resultaten als voldoende bewijs worden beschouwd dat de stof geen corrosie of irritatie veroorzaakt.

Resultaten van in vitro of ex vivo tests (stappen 5 en 6). Stoffen waarvan met een gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* test (6) (7), die voor de beoordeling van deze specifieke effecten is opgezet, is aangetoond dat ze corrosieve of ernstig irriterende eigenschappen hebben, behoeven niet bij dieren te worden getest. Er kan worden aangenomen dat dergelijke stoffen *in vivo* vergelijkbare hevige effecten veroorzaken.

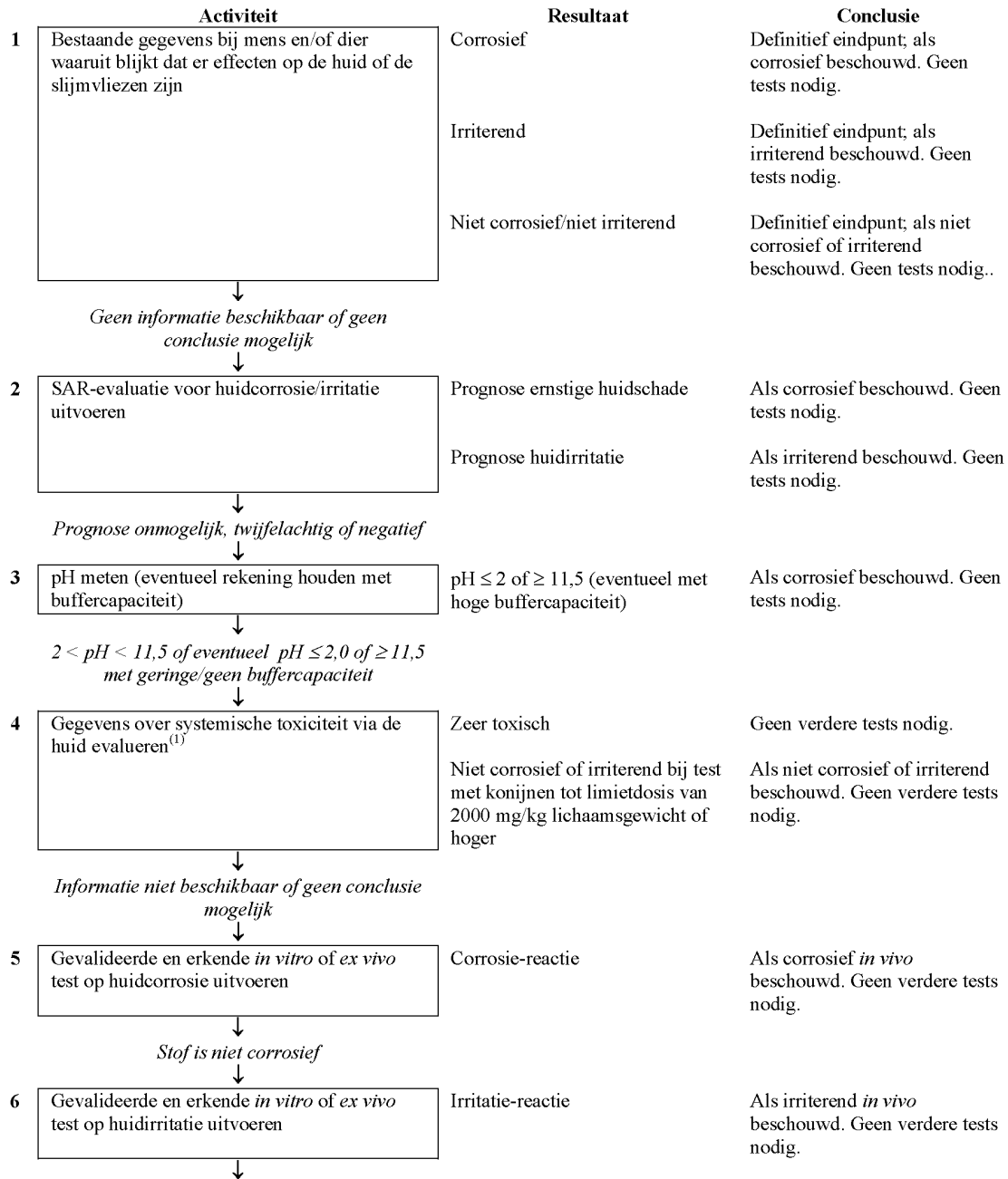
In vivo test bij konijnen (stappen 7 en 8). Wanneer op grond van de bewijskracht wordt besloten over te gaan tot *in vivo* tests, dient eerst een voorlopige test met één dier te worden gedaan. Als de resultaten van deze test erop wijzen dat de stof corrosief voor de huid is, dienen er geen verdere tests te worden uitgevoerd. Als er bij de voorlopige test geen corrosief effect wordt waargenomen, moet de irritatie-reactie of de negatieve respons worden bevestigd met ten hoogste nog eens twee dieren gedurende een blootstellingsperiode van vier uur. Als er bij de voorlopige test een irritatie-reactie wordt waargenomen, kan de bevestigingstest sequentieel of door gelijktijdige blootstelling van de twee dieren worden uitgevoerd.

REFERENTIES

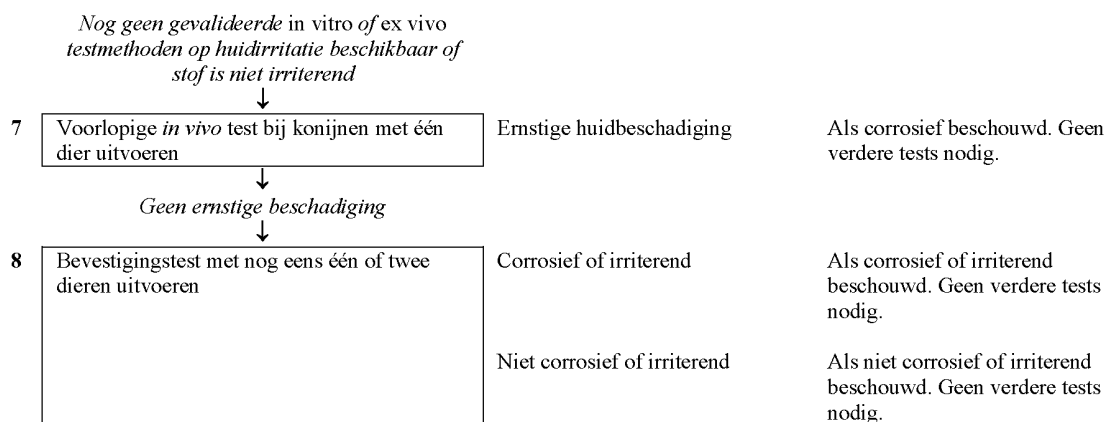
- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme : Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/tests/background.htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) pp 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in : Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors) : *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.
- (6) Testmethode B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483-524.

FIGUUR

TEST- EN EVALUATIESTRATEGIE VOOR HUIDIRRITATIE/CORROSIE



⁽¹⁾ Kan eventueel vóór de stappen 2 en 3 gebeuren.



»

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,

R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,

B. TOBACK

Bijlage 1 E

« B.5. ACUTE TOXICITEIT : OOGIRRITATIE/CORROSIE

1 METHODE

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 405 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Bij de samenstelling van deze bijgewerkte methode is bijzondere aandacht besteed aan mogelijke verbeteringen via de evaluatie van alle bestaande informatie over de teststof om onnodige tests bij proefdieren te vermijden en zodoende rekening te houden met de bezorgdheid omtrent het welzijn van dieren. In deze methode wordt de aanbeveling opgenomen de bestaande relevante gegevens op bewijskracht te analyseren (1), alvorens de beschreven *in vivo* test op acute oogirritatie/corrosie wordt uitgevoerd. Wanneer er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn, wordt aanbevolen deze aan te vullen door een sequentiële teststrategie te volgen (2) (3). De aanbevolen teststrategie omvat de uitvoering van gevalideerde en erkende *in vitro* tests en is als bijlage bij de testmethode opgenomen. Bovendien wordt aanbevolen als prognose voor oogcorrosie een *in vivo* test op huidirritatie/corrosie uit te voeren alvorens een *in vivo* oogtest te overwegen.

In het belang van zowel wetenschappelijke kwaliteit als het dierenwelzijn moeten er geen *in vivo* tests worden overwogen voordat alle beschikbare gegevens over de mogelijke oogcorrosie/irritatie door de stof zijn geëvalueerd op bewijskracht. Hierbij gaat het bijvoorbeeld om de resultaten van eerdere studies bij mensen en/of proefdieren, gegevens over corrosie/irritatie door een of meer qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen, gegevens waaruit blijkt dat de stof sterk zuur of sterk alkalisch is (4) (5), en resultaten van gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* tests op huidcorrosie en -irritatie (6) (6a). De studies kunnen al vóór de bewijskrachtanalyse zijn uitgevoerd, maar dit kan ook naar aanleiding van deze analyse gebeuren.

Voor bepaalde stoffen kan uit een dergelijke analyse blijken dat er een *in vivo* onderzoek naar een mogelijke oogcorrosie/irritatie door de stof nodig is. In al deze gevallen verdient het de voorkeur, alvorens het gebruik van de *in vivo* oogtest te overwegen, eerst overeenkomstig testmethode B.4 (7) een onderzoek naar de *in vivo* huideffecten van de stof uit te voeren en te beoordelen. Door toepassing van een bewijskrachtanalyse en de sequentiële teststrategie zal het minder vaak nodig zijn de *in vivo* test op oogcorrosie/irritatie uit te voeren met stoffen waarvoor al voldoende bewijsmateriaal uit andere studies bestaat. Als met de sequentiële teststrategie niet kan worden bepaald of er sprake is van een mogelijke oogcorrosie of -irritatie, zelfs na de uitvoering van een *in vivo* onderzoek naar huidcorrosie en -irritatie, kan een *in vivo* test op oogcorrosie/irritatie worden uitgevoerd.

Een aanbevolen sequentiële teststrategie, waarin de uitvoering van gevalideerde *in vitro* of *ex vivo* tests op corrosie/irritatie is opgenomen, is in de bijlage van deze testmethode opgenomen. De strategie is ontwikkeld tijdens een OESO-workshop (8), met algemene stemmen door de deelnemers aanbevolen en als aanbevolen teststrategie opgenomen in het "Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances" (GHS) (9). Hoewel deze sequentiële teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B.5 is, wordt aanbevolen deze teststrategie te volgen alvorens *in vivo* tests uit te voeren. Voor nieuwe stoffen is het de aanbevolen stapsgewijze testbenadering om wetenschappelijk verantwoorde gegevens over corrosie/irritatie door de stof te verkrijgen. Wanneer er voor bestaande stoffen onvoldoende gegevens over de huid- en oogcorrosie/irritatie beschikbaar zijn, moet de strategie worden gebruikt om ontbrekende gegevens aan te vullen. Voor het gebruik van een andere teststrategie of -procedure of de beslissing om geen stapsgewijze testbenadering te volgen moet een motivering worden gegeven.

1.2 DEFINITIES

Oogirritatie : het ontstaan van veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig reversibel zijn.

Oogcorrosie : het ontstaan van weefselbeschadiging in het oog of een ernstige fysieke zichtvermindering na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen niet volledig reversibel is.

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in één dosis op een van de ogen van het proefdier aangebracht; het onbehandelde oog wordt als controle gebruikt. De mate van oogirritatie/corrosie wordt geëvalueerd door op bepaalde tijdstippen het letsel aan de conjunctiva, de cornea en de iris in te schalen. Ook andere effecten in het oog en schadelijke systemische effecten worden beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de studie moet voldoende zijn om te kunnen beoordelen of de effecten reversibel of irreversibel van aard zijn.

Dieren die gedurende een fase van de test voortdurend tekenen van ernstig ongerief en/of hevige pijn vertonen, moeten op humane wijze worden gedood en de stof dient dienovereenkomstig te worden beoordeeld. Voor criteria voor de beslissing om stervende en hevig lijdende dieren op humane wijze te doden wordt verwezen naar referentie (10).

1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 Voorbereiding van de *in vivo* test

1.4.1.1 Keuze van de soort

Als proefdier wordt de voorkeur gegeven aan het albino konijn en er worden gezonde jonge volwassen dieren gebruikt. Wanneer er een andere stam of soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

1.4.1.2 Voorbereiding van de dieren

Beide ogen van ieder voorlopig voor de test geselecteerd proefdier worden binnen 24 uur vóór het begin van de test onderzocht. Dieren die aan oogirritatie, oogandoeningen of een reeds bestaand cornealetsel lijden, mogen niet worden gebruikt.

1.4.1.3 Huisvesting en voeding

De dieren worden in aparte kooien gehuisvest. De temperatuur in de proefdierruimte dient voor konijnen 20°C (\pm 3°C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

1.4.2 Testprocedure

1.4.2.1 Het aanbrengen van de teststof

De teststof wordt bij elk dier aangebracht in de conjunctivaalzak van één oog, waarbij het onderste ooglid voorzichtig van de oogbol wordt weggetrokken. Vervolgens worden de oogleden ongeveer één seconde zachtjes dichtgehouden om verlies van het materiaal te voorkomen. Het andere oog, dat niet behandeld wordt, fungeert als controle.

1.4.2.2 Irrigatie

De ogen van de proefdieren mogen gedurende ten minste 24 uur na het indruppelen van de teststof niet worden uitgewassen, tenzij het om een vaste stof gaat (zie punt 1.4.2.3.2) of wanneer er sprake is van onmiddellijke corrosieve of irriterende effecten. Na 24 uur mogen de ogen eventueel worden uitgewassen.

Het gebruik van een satellietgroep om de invloed van het uitwassen te onderzoeken wordt niet aanbevolen, tenzij dit wetenschappelijk verantwoord is. Als er een satellietgroep nodig is, dienen hiervoor twee konijnen te worden gebruikt. De wijze van uitwassen, waarbij het bijvoorbeeld gaat om het tijdstip, de samenstelling en temperatuur van de wasvloeistof, de duur, het volume en de stroomsnelheid, moet zorgvuldig worden vastgelegd.

1.4.2.3 Dosisniveau

1.4.2.3.1 Vloeibare teststoffen

Bij vloeibare teststoffen wordt een dosis van 0,1 ml gebruikt. Er mogen geen sproeiompjes worden gebruikt om de stof rechtstreeks in het oog te brengen. De vloeistof wordt na het sproeien opgevangen en vervolgens wordt 0,1 ml in het oog gedruppeld.

1.4.2.3.2 Vaste teststoffen

Bij het testen van vaste stoffen, pasta's en vaste deeltjes wordt een hoeveelheid met een volume van 0,1 ml of een gewicht van ten hoogste 100 mg gebruikt. Het testmateriaal wordt tot een fijn poeder vermalen. Alvorens het volume te meten wordt het vaste materiaal licht ingeklonken, bijvoorbeeld door tegen de houder te tikken. Als de vaste stof op het eerste observatietijdstip (1 uur na de behandeling) nog niet door fysiologische mechanismen uit het oog wordt verwijderd, kan het oog met fysiologisch zout of gedestilleerd water worden uitgewassen.

1.4.2.3.3 Aërosol-teststoffen

Aanbevolen wordt alle sproeivloeistoffen en aërosolen op te vangen voordat ze in het oog worden gedruppeld. Er wordt alleen een uitzondering gemaakt voor stoffen in spuitbussen onder druk, die niet kunnen worden opgevangen omdat ze verdampen. In deze gevallen wordt het oog opgehouden en wordt de teststof aan het oog toegediend door in één keer gedurende ongeveer één seconde vanaf een afstand van 10 cm recht voor het oog te spuiten. Deze afstand kan afhankelijk van de druk van de nevel en de inhoud worden aangepast. Er moet voor worden gezorgd dat het oog niet door de druk van de nevel wordt beschadigd. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn na te gaan of een "mechanische" beschadiging van het oog door de druk van de nevel mogelijk is.

De dosis uit een spuitbus kan door een simulatie als volgt worden geraamd : de stof wordt door een opening die zo groot is als het oog van een konijn en recht voor het papier wordt gehouden, op een weegpapierje gespoten. De gewichtstoename van het papier wordt gebruikt voor een benadering van de hoeveelheid die in het oog wordt gespoten. Bij vluchtige stoffen kan de dosis worden geraamd door een opvangbakje voor en na de verwijdering van het testmateriaal te wegen.

1.4.2.4 Voorlopige test (*in vivo* test op oogirritatie/corrosie met één dier)

Zoals in de sequentiële teststrategie (zie bijlage 1) wordt gesteld, is het zeer wenselijk dat de *in vivo* test in eerste instantie met één dier wordt uitgevoerd.

Als de resultaten van deze test erop wijzen dat de stof bij gebruik van de beschreven procedure corrosief of hevig irriterend is, dienen er geen verdere tests op oogirritatie te worden uitgevoerd.

1.4.2.5 Lokale anestetica

Van geval tot geval kan worden bekeken of er lokale anestetica moeten worden gebruikt. Als de bewijskrachtanalyse erop wijst dat de stof pijn kan veroorzaken of als uit de eerste tests blijkt dat er een pijnlijke reactie optreedt, kan vóór het indruppelen van de teststof een lokaal anestheticum worden toegediend. De aard, de concentratie en de dosis van het lokaal anestheticum moeten met zorg worden gekozen om ervoor te zorgen dat het gebruik niet leidt tot verschillen in de reactie op de teststof. Het controle-oog moet op dezelfde wijze worden verdoofd.

1.4.2.6 Bevestigende test (in vivo test op oogirritatie/corrosie met meer dieren)

Als er bij de voorlopige test geen corrosie-reactie wordt waargenomen, moet de irritatie of negatieve reactie worden bevestigd met nog eens twee dieren. Als er bij de voorlopige test hevige irritatie wordt waargenomen, hetgeen wijst op een mogelijk hevig (irreversibel) effect bij de bevestigende test, wordt aanbevolen de bevestigende test op sequentiële wijze bij één dier tegelijk uit te voeren en de twee andere dieren niet tegelijkertijd bloot te stellen. Als er bij het tweede dier corrosieve of hevig irriterende effecten optreden, wordt de test niet voortgezet. Er kunnen extra dieren nodig zijn om een zwakke of matige irritatie-reactie te bevestigen.

1.4.2.7 Observatieperiode

De duur van de observatieperiode moet voldoende zijn om de omvang en de reversibiliteit van de waargenomen effecten volledig te kunnen beoordelen. Het experiment moet echter worden beëindigd zodra het dier voortdurend tekenen van hevige pijn of ernstig ongerief vertoont (9). Om te bepalen of de effecten reversibel zijn, moeten de dieren normaal gesproken gedurende 21 dagen na de toediening van de teststof worden geobserveerd. Als al vóór het verstrijken van de 21 dagen wordt geconstateerd dat de effecten reversibel zijn, wordt het experiment op dat moment beëindigd.

1.4.2.7.1 Klinische observatie en inschaling van de oogreacties

De ogen worden 1, 24, 48 en 72 uur na het aanbrengen van de teststof onderzocht. De dieren worden niet langer dan nodig voor de test ingezet zodra er definitieve informatie is verkregen. Dieren die voortdurend tekenen van hevige pijn of ernstig ongerief vertonen, moeten op humane wijze worden gedood en de stof dient dienovereenkomstig te worden beoordeeld. Dieren die na de indruppeling de volgende oogletsels ontwikkelen, moeten op humane wijze worden gedood : perforatie van de cornea, significante ulceratie van de cornea en stafyloom; bloed in de voorste oogkamer; klasse 4 troebelheid van de cornea die gedurende 48 uur aanhoudt; afwezigheid van een lichtreflex (iris-reactie klasse 2) die gedurende 72 uur aanhoudt; ulceratie van de conjunctivae; necrose van de conjunctivae of het knipvlies; loslatend dood weefsel. De reden hiervoor is dat dergelijke letsels in het algemeen irreversibel zijn.

Wanneer de dieren geen oogletsel ontwikkelen, mag de test niet eerder dan drie dagen na de indruppeling worden beëindigd. Dieren met licht tot matig letsel moeten worden geobserveerd tot het letsel verdwijnt of gedurende 21 dagen; op dat tijdstip wordt de test dan afgesloten. Op dag 7, dag 14 en dag 21 worden de dieren geobserveerd om te bepalen wat de status van het letsel is en of het reversibel of irreversibel is.

Bij elk onderzoek wordt de score van de oogreactie (conjunctivae, cornea en iris) geregistreerd (zie tabel 1). Ook ander letsel in het oog (zoals pannus of verkleuring) en schadelijke systemische effecten worden gerapporteerd.

Het onderzoek van de respons kan worden vergemakkelijkt door het gebruik van een binoculaire loep, een hand-spleetlamp, een biomicroscop of andere geschikte apparatuur. Na de registratie van de observaties na 24 uur kunnen de ogen nader worden onderzocht met behulp van fluoresceïne

De inschaling van oogreacties is per definitie subjectief. Om harmonisatie bij de inschaling van oogreacties te bevorderen en ter ondersteuning van de testlaboratoria en de personen die bij het uitvoeren en het interpreteren van de observatie betrokken zijn, moet het personeel dat de observatie uitvoert afdoende zijn opgeleid in het gebruikte scoresysteem. De inschaling van de oogreacties moet blind gebeuren.

2 GEGEVENS

2.1 EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De scores voor de oogirritatie worden in samenhang met de aard en ernst van het letsel en de vraag of dit al dan niet reversibel is, beoordeeld. De individuele scores vormen geen absolute norm voor de irriterende eigenschappen van een materiaal, aangezien ook andere effecten van het testmateriaal worden beoordeeld. De individuele scores moeten veeleer als referentiewaarden worden beschouwd en zijn alleen zinvol wanneer ze worden ondersteund door een volledige beschrijving en evaluatie van alle observaties.

3 RAPPORTAGE

3.1 TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen :

Motivering voor *in vivo* test : bewijskrachtanalyse van reeds bestaande testgegevens, zoals de resultaten van een sequentiële teststrategie :

- een beschrijving van de relevante gegevens die van eerdere tests beschikbaar zijn;
- de gegevens die bij elke stap van de teststrategie verkregen zijn;
- een beschrijving van de uitgevoerde *in vitro* tests met een gedetailleerde beschrijving van de procedures en de resultaten die met test/referentiestoffen verkregen zijn;
- een beschrijving van het uitgevoerde *in vivo* onderzoek op huidirritatie/corrosie met de verkregen resultaten;
- een bewijskrachtanalyse voor de uitvoering van het *in vivo* onderzoek.

Teststof :

- identificatiegegevens (b.v. het CAS-nr., de herkomst, de zuiverheid, bekende verontreinigingen en het chargennummer);
- de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (b.v. de pH, de vluchtigheid, de oplosbaarheid, de stabiliteit en de reactiviteit met water);
- bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;
- als een lokaal anestheticum is gebruikt : identificatiegegevens, de zuiverheid, het type, de dosis en de potentiële interactie met de teststof.

Medium :

- identificatiegegevens, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume;
- een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren :

- de gebruikte soort/stam en een motivering indien andere dieren dan het albino konijn worden gebruikt;
- de leeftijd van elk dier aan het begin van het onderzoek;
- het aantal dieren van elk geslacht in de test- en controlegroep (indien deze nodig is);
- het gewicht van elk dier aan het begin en het eind van de test;
- de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.

Resultaten :

- een beschrijving van de methode die is gebruikt om de irritatie op elk observatietijdstip in te schalen (bijvoorbeeld hand-spleetlamp, biomicroscop of fluoresceïne);
- een tabel met de gegevens van de irritatie/corrosie-reactie voor elk dier op elk observatietijdstip tot het moment waarop elk dier uit de test wordt genomen;
- een beschrijving in woorden van de ernst en de aard van de waargenomen irritatie of corrosie;
- een beschrijving van alle andere in het oog waargenomen letsels (bijvoorbeeld vascularisatie, pannusvorming, verkleving en verkleuring);
- een beschrijving van schadelijke lokale effecten buiten het oog en schadelijke systemische effecten en eventuele histopathologische bevindingen.

Bespreking van de resultaten.**3.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN**

Een extrapolatie van de resultaten van het onderzoek naar oogirritatie bij proefdieren naar de mens heeft slechts een beperkte geldigheid. In veel gevallen is het albino konijn gevoeliger voor stoffen die oogirritatie of -corrosie veroorzaken dan de mens.

Bij de interpretatie van de resultaten moet ervoor worden gezorgd dat irritatie ten gevolge van secundaire infectie wordt uitgesloten.

4 REFERENTIES

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 - 429.
- (2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential : Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159 - 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 - 26.
- (5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 - 231.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483 - 524.
- (6a) Testmethode B.40 : Huidcorrosie.
- (7) Testmethode B.4 : Acute toxiciteit : huidirritatie/corrosie.
- (8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme : Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

TABEL I : INSCHALING VAN HET OOGLETSEL

Cornea

Troebelheid : dichtheidsgraad (wordt afgelezen in het gebied met de grootste dichtheid) *	
Geen ulceratie of troebelheid.....	0
Verspreide of diffuse troebele gebieden (meer dan een lichte vertroebeling van de normale glans); details van de iris duidelijk zichtbaar	1
Gemakkelijk te onderscheiden doorschijnend gebied; details van de iris enigszins vervaagd.....	2
Parelmoerachtig gebied; details van de iris niet zichtbaar; omvang van de pupil nauwelijks zichtbaar.	3
Troebele cornea; iris niet zichtbaar door de troebelheid.....	4

Maximale score : 4

* Er moet worden aangegeven welk gebied van de cornea troebel is

Iris

Normaal.....	0
Duidelijk verdiepte rugae, congestie, zwelling, matige hyperemie rond de cornea of injectie; iris reageert op licht (een trage reactie wordt als een effect beschouwd).....	1
Bloeding, macroscopische destructie of geen reactie op licht.....	2

Maximale score : 2

Conjunctivae

Roodheid (geldt voor palpebrale en bulbaire conjunctivae; niet voor cornea en iris)	
Normaal.....	0
Hyperemie in sommige bloedvaten (geïnjecteerd).....	1
Diffuse karmozijnrode kleur; individuele vaten niet gemakkelijk zichtbaar	2
Diffuse dieprode kleur.....	3

Maximale score : 3

Chemosis

Zwelling (geldt voor oogleden en/of knipvliezen)	
Normaal.....	0
Iets meer zwelling dan normaal.....	1
Duidelijke zwelling met gedeeltelijk uitpuilende oogleden.....	2
Zwelling met ongeveer half gesloten oogleden.....	3
Zwelling met meer dan half gesloten oogleden.....	4

Maximale score : 4

Bijlage**Een sequentiële teststrategie voor oogirritatie en -corrosie****ALGEMENE OVERWEGINGEN**

In het belang van verantwoorde wetenschap en het welzijn van dieren is het belangrijk dat het onnodig gebruik van dieren wordt vermeden en dat tests waarvan hevige reacties bij dieren worden verwacht, tot een minimum worden beperkt. Alle informatie over een stof die relevant is voor de mogelijke oogirritatie/corrosie door die stof moet worden geëvalueerd voordat een *in vivo* test wordt overwogen. Wellicht bestaat er al voldoende bewijsmateriaal om een teststof qua mogelijke oogirritatie of -corrosie in te delen zonder dat er tests bij proefdieren behoeven te worden uitgevoerd. Daarom zal het gebruik van een bewijskrachtanalyse en een sequentiële teststrategie de noodzaak van *in vivo* tests tot een minimum beperken, vooral als er van de stof hevige reacties worden verwacht.

Er wordt aanbevolen dat een bewijskrachtanalyse wordt gebruikt om bestaande informatie over oogirritatie en -corrosie door stoffen te evalueren en om te bepalen of ander aanvullend onderzoek dan *in vivo* oogonderzoek moet worden uitgevoerd om te helpen bij de bepaling van deze mogelijke effecten. Wanneer nader onderzoek nodig is, wordt aanbevolen de sequentiële teststrategie te gebruiken om de relevante experimentele gegevens te verkrijgen. Voor stoffen die nog niet zijn getest, moet de sequentiële teststrategie worden gebruikt om de gegevens te vergaren die nodig zijn om de oogcorrosie/irritatie te bepalen. De in deze bijlage beschreven teststrategie is tijdens een OESO-workshop (1) ontwikkeld. Later is zij bevestigd en opgenomen in het "Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances", die de steun heeft gekregen van de 28e gezamenlijke vergadering van het Comité chemische stoffen en de Werkgroep chemische stoffen in november 1998 (2).

Hoewel deze teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B.5 is, vormt zij de aanbevolen aanpak voor de bepaling van de eigenschappen qua oogirritatie/corrosie. Deze aanpak houdt zowel een optimale gedragscode als een ethische referentie voor *in vivo* tests op oogirritatie/corrosie in. De testmethode bevat een leidraad voor de uitvoering van de *in vivo* test en geeft een overzicht van de factoren die vóór het overwegen van een dergelijke test in aanmerking moeten worden genomen. De sequentiële teststrategie levert een bewijskracht-benadering voor de evaluatie van bestaande gegevens over de eigenschappen van stoffen inzake oogirritatie/corrosie en een trapsgewijze aanpak voor het vergaren van relevante gegevens over stoffen waarvoor nader onderzoek nodig is of waarvoor nog geen onderzoek is uitgevoerd. De strategie houdt in dat onder bepaalde omstandigheden eerst gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* tests en vervolgens testmethode B.4 op huidirritatie/corrosie worden uitgevoerd (3) (4).

BESCHRIJVING VAN DE STAPSGEWIJZE TESTSTRATEGIE

Alvorens te beginnen met tests als onderdeel van de sequentiële teststrategie (zie figuur), moet alle beschikbare informatie worden geëvalueerd om te bepalen of *in vivo* oogonderzoek nodig is. Hoewel de evaluatie van individuele parameters (bijvoorbeeld een extreme pH) significante informatie kan opleveren, moet alle bestaande informatie worden geëvalueerd. Alle relevante gegevens over de effecten van de betrokken stof en de qua structuur analoge verbindingen moeten bij het nemen van een beslissing over de bewijskracht worden geëvalueerd en er moet een motivering voor de beslissing worden gegeven. De nadruk moet in eerste instantie liggen op bestaande gegevens over de effecten van de stof bij mens en dier en vervolgens op de resultaten van *in vitro* of *ex vivo* tests. Waar mogelijk moet *in vivo* onderzoek aan corrosieve stoffen worden vermeden. Bij de teststrategie spelen de volgende factoren een rol :

Evaluatie van bestaande gegevens over de effecten bij mens en dier (stap 1). In de eerste plaats moet worden gekeken naar bestaande gegevens over de effecten bij de mens, zoals klinisch en bedrijfsgeneeskundig onderzoek en ziektegevallen, en/of gegevens van oogonderzoek bij proefdieren, omdat deze informatie opleveren die rechtstreeks verband houdt met oogeffecten. Vervolgens moeten de beschikbare gegevens van onderzoek bij mens en/of dier naar huidcorrosie/irritatie worden geëvalueerd. Stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief of hevig irriterend voor het oog zijn, mogen niet in de ogen van dieren worden gedruppeld en dit geldt ook voor stoffen met corrosieve of irriterende effecten op de huid; deze stoffen moeten ook als corrosief en/of irriterend voor het oog worden beschouwd. Ook stoffen waarvoor bij eerder uitgevoerd oogonderzoek afdoende is aangetoond dat ze niet corrosief en niet irriterend zijn, dienen niet meer bij *in vivo* oogonderzoek te worden getest.

Analyse van structuur/activiteit-relaties (SAR) (stap 2). Er moet worden gekeken naar de resultaten van tests met qua structuur verwante chemische stoffen, indien deze beschikbaar zijn. Wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn over de effecten van qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen bij mens en/of dier om te kunnen concluderen dat deze oogcorrosie/irritatie kunnen veroorzaken, mag worden aangenomen dat de teststof tot dezelfde reacties zal leiden. In dat geval hoeft de stof wellicht niet te worden getest. Negatieve gegevens van onderzoek met qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen vormen in het kader van de sequentiële teststrategie niet een afdoende bewijs dat de stof geen corrosie of irritatie veroorzaakt. Voor de bepaling van de potentie voor zowel huidcorrosie en -irritatie als oogcorrosie en -irritatie moeten gevalideerde en erkende SAR-methoden worden gebruikt.

Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit (stap 3). Stoffen met een extreme pH van bijvoorbeeld $\leq 2,0$ of $\geq 11,5$ kunnen hevige lokale effecten hebben. Als een stof op basis van een extreme pH als corrosief of irriterend voor het oog wordt aangeduid, kan ook rekening worden gehouden met zijn zuur/alkalireserve (buffercapaciteit) (5) (6). Als de buffercapaciteit erop wijst dat een stof wellicht *niet* corrosief voor het oog is, moeten er nadere tests worden uitgevoerd om dit te bevestigen, waarbij bij voorkeur een gevalideerde en erkende *in vitro* of *ex vivo* test moet worden gebruikt (zie het gedeelte over de stappen 5 en 6).

Overweging van andere bestaande informatie (stap 4). In deze fase moet alle beschikbare informatie over systemische toxiciteit via de huid worden geëvalueerd. Ook de acute huidtoxiciteit van de teststof moet in de overwegingen worden betrokken. Als er is aangetoond dat de teststof via de huid zeer toxisch is, behoeft deze wellicht niet in het oog te worden getest. Hoewel er niet noodzakelijkerwijs een verband is tussen acute huidtoxiciteit en oogirritatie/corrosie, kan worden aangenomen dat een stof die via de huid zeer toxisch is, ook bij indruppelen in het oog hoge toxiciteit zal vertonen. Deze gegevens kunnen ook tussen de stappen 2 en 3 worden gezien.

Resultaten van in vitro of ex vivo tests (stappen 5 en 6). Stoffen waarvan met een *in vitro* of *ex vivo* test (7) (8), die specifiek voor de beoordeling van oog- of huidcorrosie/irritatie is gevalideerd en erkend, is aangetoond dat ze corrosieve of hevig irriterende eigenschappen hebben, behoeven niet bij dieren te worden getest. Er kan worden aangenomen dat dergelijke stoffen *in vivo* vergelijkbare hevige effecten veroorzaken. Als er geen gevalideerde en erkende *in vitro/ex vivo* tests beschikbaar zijn, worden de stappen 5 en 6 overgeslagen en wordt direct doorgedaan naar stap 7.

Evaluatie van in vivo huidirritatie of -corrosie door de stof (stap 7). Wanneer er onvoldoende bewijsmateriaal bestaat voor de uitvoering van een doorslaggevende bewijskrachtanalyse van de mogelijke oogirritatie/corrosie door een stof op basis van gegevens uit bovengenoemde onderzoeken, moet eerst de mogelijke *in vivo* huidirritatie/corrosie worden geëvalueerd met behulp van testmethode B.4 (4) en de bijbehorende bijlage (9). Als blijkt dat de stof huidcorrosie of hevige huidirritatie veroorzaakt, moet deze worden beschouwd als een stof die oogcorrosie veroorzaakt, tenzij er andere informatie is die tot een andere conclusie leidt. Dit betekent dat er dan geen *in vivo* test op oogirritatie hoeft te worden uitgevoerd. Als de stof voor de huid niet corrosief of hevig irriterend is, moet er een *in vivo* test op oogirritatie worden uitgevoerd.

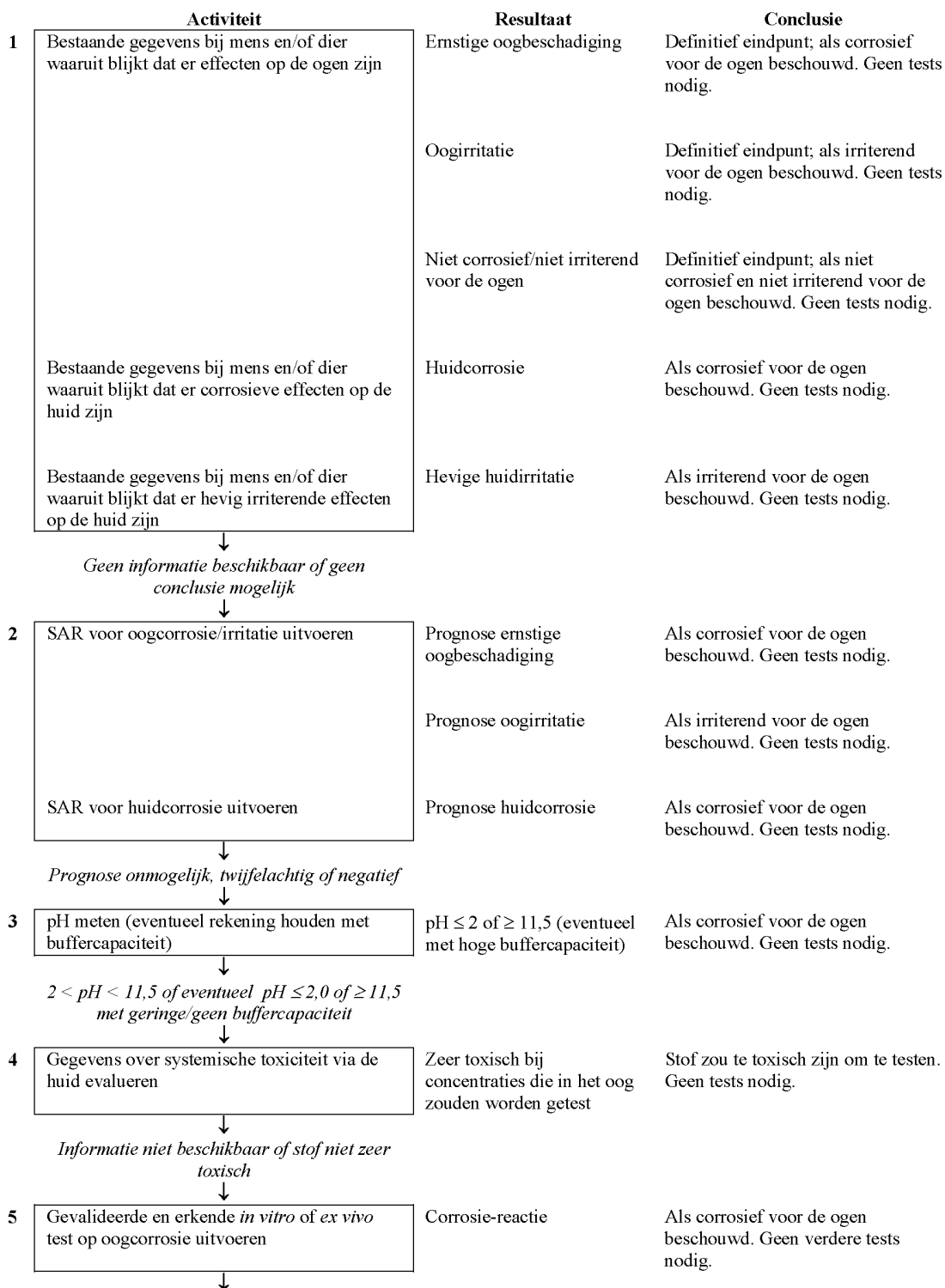
In vivo test bij konijnen (stappen 8 en 9). Een *in vivo* oogonderzoek dient te beginnen met een voorlopige test met één dier. Als de resultaten van deze test erop wijzen dat de stof hevig irriterend of corrosief voor de ogen is, dienen er geen verdere tests te worden uitgevoerd. Als er bij deze test geen corrosief of hevig irriterend effect wordt waargenomen, wordt er een bevestigende test met nog eens twee dieren uitgevoerd.

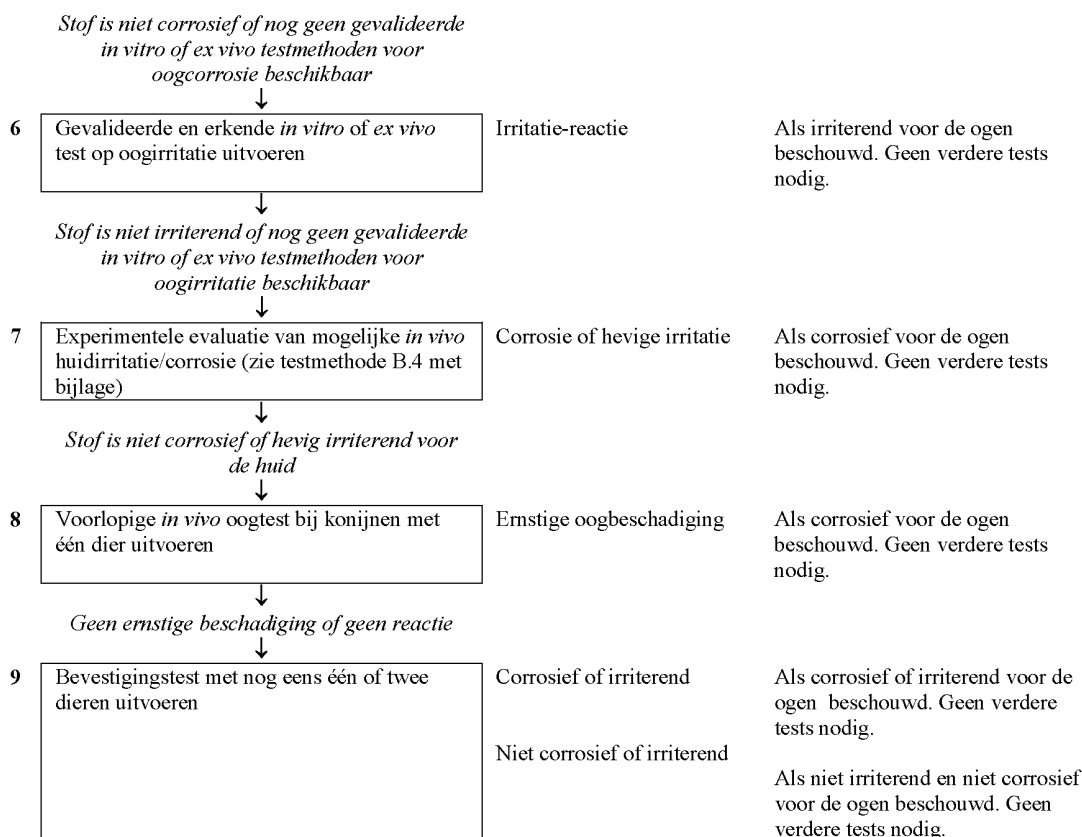
REFERENTIES

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme : Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Testmethode B.4 : Acute toxiciteit : huidirritatie/corrosie.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19-26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.
- (8) Testmethode B.40 : Huidcorrosie.
- (9) Bijlage van testmethode B.4 : Een sequentiële teststrategie voor huidirritatie en -corrosie.

FIGUUR

TEST- EN EVALUATIESTRATEGIE VOOR OOGIRRITATIE/CORROSIE





»

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Bijlage 1 F

« B.31. ONDERZOEK NAAR DE PRENATALE ONTWIKKELINGSTOXICITEIT

1 METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 414 (2001) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Deze testmethode voor ontwikkelingstoxiciteit is bedoeld om algemene informatie te verschaffen over de effecten van prenatale blootstelling op het drachtige proefdier en het zich ontwikkelende organisme in utero; daarbij kunnen de effecten op het moederdier en het afsterven, structurele abnormaliteiten of afwijkende groei bij de foetus worden bepaald. Functionele gebreken zijn weliswaar een belangrijk aspect van ontwikkeling, maar zijn niet in deze testmethode opgenomen. Hierop kan worden getest door een apart onderzoek uit te voeren of door als uitbreiding van dit onderzoek de testmethode voor ontwikkelingsneurotoxiciteit uit te voeren. Voor informatie over het testen op functionele gebreken en andere postnatale effecten kan waar nodig de testmethode voor het reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties en het onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit worden geraadpleegd.

Specifieke aanpassingen van deze testmethode op basis van specifieke kennis omtrent bijvoorbeeld de fysisch-chemische of toxicologische eigenschappen van de teststof kunnen in bepaalde gevallen nodig zijn. Dergelijke aanpassingen zijn aanvaardbaar wanneer overtuigend wetenschappelijk bewijsmateriaal erop wijst dat de test door de aanpassing meer informatie oplevert. In zo'n geval dient het wetenschappelijk bewijsmateriaal zorgvuldig in het verslag te worden vermeld.

1.2 DEFINITIES

Ontwikkelingstoxicologie : de bestudering van schadelijke effecten op het zich ontwikkelende organisme die kunnen voortvloeien uit blootstelling vóór de bevruchting, tijdens de prenatale ontwikkeling of postnataal tot het tijdstip van geslachtelijke rijping. De belangrijkste uitingen van ontwikkelingstoxiciteit zijn : 1) dood van het organisme, 2) structurele abnormaliteiten, 3) afwijkende groei en 4) functionele gebreken. Ontwikkelingstoxicologie werd vroeger vaak teratologie genoemd.

Schadelijk effect : een aan de behandeling gerelateerde afwijking van de normale toestand die het vermogen van een organisme om te overleven, zich te reproduceren of zich aan de omgeving aan te passen vermindert. In het kader van de ontwikkelingstoxicologie in de ruimste zin vallen hier alle effecten onder die de normale ontwikkeling van de vrucht zowel voor als na de geboorte storen.

Afwijkende groei : een afwijking in het gewicht of de grootte van een of meer organen of het lichaam van een jong.

Afwijkingen (anomalieën) : structurele afwijkingen in de ontwikkeling; hieronder vallen zowel misvormingen als variaties (28).

Misvorming/ ernstige abnormaliteit : een structurele verandering die als schadelijk voor het dier wordt beschouwd (en ook dodelijk kan zijn) en meestal zelden voorkomt.

Variatie/ lichte abnormaliteit : een structurele verandering die wordt geacht weinig of geen nadelige gevolgen voor het dier te hebben; deze kan van voorbijgaande aard zijn en betrekkelijk vaak in de controlepopulatie voorkomen.

Vrucht : alles wat in enige fase van de ontwikkeling vanaf de bevruchting tot de geboorte uit een bevruchte eicel ontstaat, met inbegrip van de extra-embryonale vliezen alsmede het embryo of de foetus.

Implantatie (innesteling) : de hechting van de blastocyst aan de epitheelbekleding van de uterus, met inbegrip van de penetratie door het epitheel van de uterus en de inbedding in het endometrium.

Embryo : de vroege of ontwikkelingsfase van een organisme, meer in het bijzonder het ontwikkelingsproduct van de bevruchting van een eicel nadat de lange as verschenen is en totdat alle belangrijke structuren aanwezig zijn.

Embryotoxiciteit : schadelijke effecten op de normale structuur, ontwikkeling, groei en/of levensvatbaarheid van een embryo.

Foetus : het ongebooren jong in de post-embryonale periode.

Foetotoxiciteit : schadelijke effecten op de normale structuur, ontwikkeling, groei en/of levensvatbaarheid van een foetus.

Abortus : de voortijdige uitstoting uit de uterus van de producten van de conceptie : het embryo of een niet-levensvatbare foetus.

Resorptie : een vrucht die na de implantatie in de uterus sterft en wordt of is geresorbeerd.

Vroege resorptie : aanwijzingen voor implantatie zonder als zodanig te herkennen embryo/foetus.

Late resorptie : een dood embryo of een dode foetus met uiterlijke degeneratieve veranderingen.

NOAEL : afkorting voor "no-observed-adverse-effect level" (dosis zonder waargenomen schadelijke effecten) : de hoogste dosis of het hoogste blootstellingsniveau waarbij geen aan de behandeling verbonden schadelijke effecten worden waargenomen.

1.3 REFERENTIESTOF

Geen.

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt aan drachtige dieren toegediend, normaal gesproken ten minste vanaf de implantatie tot één dag voor de dag waarop ze zullen worden gedood en deze dag dient zo dicht mogelijk bij de normale werpdatum te liggen zonder het risico te lopen dat er gegevens verloren gaan door een voortijdige worp. De testmethode is niet bedoeld om uitsluitend de organogenese-periode te onderzoeken (d.w.z. dag 5-15 bij knaagdieren en dag 6-18 bij het konijn), maar ook de effecten vanaf een eventuele pre-implantatie gedurende de gehele dracht tot de dag vóór de keizersnede. Kort voor de keizersnede worden de vrouwtjes gedood, wordt de inhoud van de uterus onderzocht en worden de foetussen onderzocht op van buitenaf zichtbare anomalieën en veranderingen in zachte weefsels en het skelet.

1.5 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1 Keuze van de diersoort

Er wordt aanbevolen de test bij de meest relevante soort uit te voeren en laboratoriumsoorten en -stammen te gebruiken die meestal bij tests op prenatale ontwikkelingstoxiciteit worden gebruikt. Van de knaagdiersoorten verdient de rat de voorkeur en van de niet-knaagdieren het konijn. Als een andere soort wordt gebruikt, dient hiervoor een motivering te worden gegeven.

1.5.2 Huisvesting en voeding

De temperatuur in de proefdierruimte dient voor knaagdieren 22 °C (± 3 °C) en voor konijnen 18 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

De dekking gebeurt in daarvoor geschikte kooien. Dieren die gedekt zijn worden bij voorkeur apart gehuisvest, maar ook groepjes met kleine aantallen dieren zijn aanvaardbaar.

1.5.3 Voorbereiding van de dieren

Er worden gezonde dieren gebruikt die gedurende ten minste 5 dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. De kenmerken van de proefdieren qua soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en/of leeftijd worden vastgelegd. De dieren van alle testgroepen dienen zo veel mogelijk hetzelfde gewicht en dezelfde leeftijd te hebben. Op elk dosisniveau worden jonge volwassen vrouwtjes gebruikt die nog geen jongen hebben gehad. De vrouwtjes worden door mannetjes van dezelfde soort en stam gedekt en dekking door mannetjes met dezelfde ouders wordt vermeden. Voor knaagdieren is dag 0 van de dracht de dag waarop een vaginale prop en/of sperma wordt waargenomen. Voor konijnen is dag 0 meestal de dag van de coïtus of kunstmatige inseminatie als deze techniek wordt gebruikt. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer. Vrouwtjes die gedekt zijn worden aselekt ingedeeld in de controle- en behandelingsgroepen en als de vrouwtjes in groepjes gedekt zijn, worden de dieren in elk groepje gelijkelijk over de groepen verdeeld. Ook vrouwtjes die door hetzelfde mannetje bevrucht zijn, worden gelijkelijk over de groepen verdeeld.

1.6 UITVOERING

1.6.1 Aantal en geslacht van de dieren

Elke test- en controlegroep bevat een zodanig aantal vrouwtjes dat er bij obductie ongeveer 20 vrouwtjesdieren met implantatieplaatsen zijn. Groepen met minder dan 16 dieren met implantatieplaatsen zullen wellicht niet aan de eisen voldoen. Sterfte bij moederdieren maakt het onderzoek niet noodzakelijkerwijs onbruikbaar, mits deze niet hoger ligt dan ongeveer 10 %.

1.6.2 Bereiding van de doses

Als een medium of een ander additief wordt gebruikt om de toediening te vergemakkelijken, moet op de volgende kenmerken worden gelet : de effecten op de resorptie, de distributie, het metabolisme en de retentie of uitscheiding van de teststof, de effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken kunnen wijzigen en de effecten op het verbruik van voer of water of de voedingstoestand van de dieren. Het medium mag geen toxische effecten op de ontwikkeling of de voortplanting hebben.

1.6.3 Dosering

Normaal gesproken wordt de teststof dagelijks toegediend vanaf de implantatie (b.v. dag 5 na de dekking) tot de dag vóór de geplande keizersnede. Als er voorbereidende onderzoeken beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen grote kans is op verlies vóór implantatie, kan de behandeling worden uitgebreid tot de volledige drachtperiode vanaf de dekking tot één dag voor de dag waarop de dieren zullen worden gedood. Het is bekend dat een onjuiste behandeling of stress tijdens de dracht tot prenataal verlies kan leiden. Om prenataal verlies door niet aan de behandeling gerelateerde factoren te voorkomen worden onnodige manipulaties van drachtige dieren en stress door externe factoren zoals geluiden vermeden.

Er worden ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controlegroep gebruikt. Gezonde dieren worden aselekt in de behandelde en controlegroepen ingedeeld. De dosisniveaus worden zodanig gekozen dat er sprake is van geleidelijk oplopende toxische effecten. Tenzij dit vanwege de fysisch/chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, wordt de hoogste dosis zodanig gekozen dat er enige ontwikkelingstoxiciteit en/of toxiciteit bij het moederdier wordt veroorzaakt (klinische verschijnselen of een afname van het lichaamsgewicht), maar geen sterfte of ernstig leed. Ten minste één lagere dosis moet minimale waarneembare toxische effecten veroorzaken. De laagste dosis mag geen verschijnselen van ontwikkelingstoxiciteit of toxiciteit bij het moederdier veroorzaken. Er wordt een dalende reeks dosisniveaus gekozen teneinde een dosis-afhankelijke respons en de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten (NOAEL) te bepalen. Intervallen van een factor twee of vier zijn vaak optimaal om de dalende dosisniveaus vast te stellen en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (b.v. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken. Hoewel het de bedoeling is een NOAEL bij het moederdier vast te stellen, kunnen ook onderzoeken waarbij een dergelijke dosis niet wordt bepaald aanvaardbaar zijn (1).

Bij de keuze van de dosisniveaus wordt rekening gehouden met eventueel bestaande gegevens over de toxiciteit en aanvullende informatie over het metabolisme en de toxicokinetiek van de teststof of verwante materialen. Deze informatie zal ook helpen aan te tonen dat het doseringsschema adequaat is.

Er wordt een gelijktijdige controlegroep gebruikt. Deze controlegroep krijgt een schijnbehandeling of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, een behandeling met medium. Aan alle groepen wordt hetzelfde volume teststof of medium toegediend. De aanpak van de dieren in de controlegroep(en) is identiek aan die van de dieren in de testgroepen. Aan de medium-controlegroepen wordt de hoogste gebruikte medium-dosis toegediend (zoals in de laagste dosisgroep).

1.6.4 Limiettest

Als een test met één dosis van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij orale toediening volgens de voor dit onderzoek beschreven procedure geen waarneembare toxiciteit bij drachtige dieren of hun jongen veroorzaakt en op grond van bestaande gegevens (b.v. over verwante verbindingen qua structuur en/of metabolisme) geen effect te verwachten valt, zal een volledig onderzoek met drie dosisniveaus wellicht niet nodig zijn. Het kan nodig zijn bij de limiettest op grond van de verwachte blootstelling van de mens een hogere orale dosis te gebruiken. Voor andere toedieningsvormen, zoals inhalatie of toediening op de huid, zal het maximaal haalbare blootstellingsniveau vaak worden bepaald en beperkt door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof (bij toediening op de huid mag bijvoorbeeld geen ernstige lokale toxiciteit optreden).

1.6.5 Toediening van de doses

De teststof of het medium wordt meestal oraal met een sonde toegediend. Als er een andere toedieningsweg wordt gebruikt, moet worden uitgelegd en gemotiveerd waarom deze gekozen is en kunnen er aanpassingen nodig zijn (2) (3) (4). De teststof wordt elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip toegediend.

De dosis voor een bepaald dier wordt normaal gesproken gebaseerd op de meest recente bepaling van het lichaamsgewicht. Bij de aanpassing van de dosis gedurende het laatste derde deel van de dracht moet echter zorgvuldigheid worden betracht. Voor de keuze van de dosis wordt gebruik gemaakt van bestaande gegevens om overmatige toxiciteit bij het moederdier te voorkomen. Als echter bij de behandelde moederdieren overmatige toxiciteit wordt geconstateerd, worden deze op humane wijze gedood. Als verschillende drachtige dieren tekenen van overmatige toxiciteit vertonen, moet worden overwogen de test bij deze dosisgroep te beëindigen. Als de stof met een sonde wordt toegediend, wordt deze bij voorkeur met behulp van een maagsonde of een geschikte catheter in één dosis aan de dieren gegeven. Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat; in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Wanneer maisolie als medium wordt gebruikt, mag het volume niet groter zijn dan 0,4 ml/100 g lichaamsgewicht. Variaties in het toegediende volume worden tot een minimum beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er voor alle dosisniveaus een constant volume wordt toegediend.

1.6.6 Observatie van de moederdieren

Ten minste eens per dag wordt er een klinische observatie uitgevoerd en vastgelegd, bij voorkeur elke dag op dezelfde tijd(en), waarbij rekening wordt gehouden met de periode na de toediening waarin de verwachte effecten maximaal zijn. De toestand van de dieren wordt geregistreerd, met inbegrip van dieren die gestorven of stervende zijn, relevante gedragsveranderingen en alle zichtbare tekenen van toxiciteit.

1.6.7 Lichaamsgewicht en voerconsumptie

De dieren worden op dag 0 van de dracht of uiterlijk op dag 3 van de dracht als door een externe fokker op een bekend tijdstip gedekte dieren worden geleverd, op de dag waarop de eerste dosis wordt toegediend, ten minste om de drie dagen gedurende de toedieningsperiode en op de dag waarop ze zullen worden gedood, gewogen.

De voerconsumptie wordt om de drie dagen geregistreerd en dit gebeurt op dezelfde dagen als waarop het lichaamsgewicht wordt bepaald.

1.6.8 Obductie

De vrouwtjes worden één dag voor de verwachte worp gedood. Vrouwtjes die vóór de dag waarop ze zullen worden gedood tekenen van abortus of voortijdige worp vertonen, worden gedood en aan een grondig macroscopisch onderzoek onderworpen.

Op het tijdstip waarop het moederdier wordt gedood of tijdens het onderzoek sterft, wordt het macroscopisch onderzoek op structurele abnormaliteiten of pathologische veranderingen. Om beïnvloeding tot een minimum te beperken worden de beoordeling van het moederdier tijdens de keizersnede en de latere analyse van de foetussen bij voorkeur uitgevoerd zonder de testgroep te kennen.

1.6.9 Onderzoek van de inhoud van de uterus

Onmiddellijk nadat het dier gedood is of zo spoedig mogelijk na sterfte wordt de uterus verwijderd en wordt nagegaan of de dieren drachtig zijn. Wanneer een dier niet drachtig lijkt, wordt de uterus nader onderzocht (bijvoorbeeld door kleuring met ammoniumsulfide voor knaagdieren en Salewski-kleuring of een andere geschikte methode voor konijnen) om dit te bevestigen (5).

De uterus van drachtige dieren wordt met de cervix gewogen. Bij drachtige dieren die tijdens het onderzoek dood zijn aangetroffen wordt het gewicht van de uterus niet bepaald.

Bij drachtige dieren wordt het aantal corpora lutea bepaald.

De inhoud van de uterus wordt onderzocht op het aantal dode embryo's of foetussen en levensvatbare foetussen. Om het relatieve tijdstip te bepalen waarop de vrucht gestorven is, wordt de mate van resorptie beschreven (zie punt 1.2).

1.6.10 Onderzoek van de foetussen

Van elke foetus worden het geslacht en het lichaamsgewicht bepaald.

Elke foetus wordt onderzocht op uitwendige afwijkingen (6).

De foetussen worden onderzocht op afwijkingen in het skelet en de zachte weefsels (zoals variaties en misvormingen of anomalieën) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Indeling van afwijkingen in de foetus in categorieën verdient de voorkeur, maar is niet noodzakelijk. Wanneer indeling wel plaatsvindt, worden de criteria voor elke categorie duidelijk vermeld. Er wordt met name gelet op de voortplantingsorganen, die op tekenen van een afwijkende ontwikkeling worden onderzocht.

Bij knaagdieren wordt ongeveer de helft van elk nest behandeld en onderzocht met het oog op skeletafwijkingen. De andere helft wordt behandeld en onderzocht met het oog op afwijkingen in zachte weefsels, waarbij erkende of geschikte methoden voor serie-snedes of zorgvuldige macroscopische ontleedtechnieken worden gebruikt.

Bij niet-knaagdieren zoals konijnen worden alle foetussen onderzocht op afwijkingen van zowel de zachte weefsels als het skelet. De lichamen van deze foetussen worden met behulp van zorgvuldige ontleedtechnieken beoordeeld op afwijkingen van de zachte weefsels, waarbij ook procedures kunnen worden gebruikt om de interne hartstructuur nader te beoordelen (25). Van de helft van de op deze wijze onderzochte foetussen wordt het hoofd verwijderd en behandeld met het oog op de beoordeling van de zachte weefsels (zoals de ogen, de hersenen, de neusgangen en de tong) met gangbare methoden voor serie-snedes (26) of een even gevoelige methode. De lichamen van deze foetussen en de overige intacte foetussen worden met behulp van dezelfde methoden als voor knaagdieren zijn beschreven, behandeld en onderzocht met het oog op skeletafwijkingen.

2 GEGEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden voor de moederdieren en hun jongen individueel gerapporteerd met een overzicht in tabelvorm, waarbij voor elke testgroep worden vermeld : het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met het oog op een humane behandeling is gedood, het tijdstip van sterfte of humane doding, het aantal drachtige vrouwtjes, het aantal dieren met toxiciteitsverschijnselen, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen met vermelding van de aanvang, de duur en de ernst van de toxische effecten, de aard van de waarnemingen bij de embryo's/foetussen en alle relevante gegevens over de nesten.

De getalsmatige resultaten worden met een geschikte statistische methode geëvalueerd, waarbij het nest als de eenheid voor gegevensanalyse wordt gebruikt. Er wordt een algemeen aanvaarde statistische methode gebruikt; de statistische methoden worden bij de opzet van het onderzoek gekozen en gemotiveerd. Ook de gegevens over de dieren die niet overleven tot het tijdstip waarop ze zouden worden gedood, worden gerapporteerd. Deze gegevens kunnen in de groepsgemiddelden worden opgenomen als dit relevant is. De relevantie van de over deze dieren verkregen gegevens, en derhalve de opname in of uitsluiting van groepsgemiddelden, moet van geval tot geval worden beoordeeld en gemotiveerd.

2.2 EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek naar de prenatale ontwikkelingstoxiciteit worden aan de hand van de waargenomen effecten beoordeeld. In deze evaluatie wordt de volgende informatie opgenomen :

- de testresultaten bij de moederdieren en de embryo's/foetussen, met inbegrip van een evaluatie van het verband of het ontbreken daarvan tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het optreden en de ernst van alle bevindingen;
- de criteria die zijn gehanteerd voor de indeling van externe afwijkingen en afwijkingen in de zachte weefsels en het skelet bij foetussen in categorieën, als deze indeling heeft plaatsgevonden;
- eventueel controlegegevens uit het verleden om de interpretatie van de resultaten van het onderzoek te bevorderen;
- de getallen die bij de berekening van alle percentages of indices zijn gebruikt;
- een adequate statistische analyse van de resultaten van het onderzoek, indien van toepassing, waarbij voldoende informatie over de analysemethode wordt vermeld, zodat een onafhankelijke evaluator/statisticus de analyse kan beoordelen en reconstrueren.

Wanneer bij een onderzoek wordt aangetoond dat er geen sprake is van toxische effecten, moet nader onderzoek worden overwogen om de resorptie en de biologische beschikbaarheid van de teststof vast te stellen.

2.3 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Een onderzoek naar de prenatale ontwikkelingstoxiciteit levert informatie op over de effecten van herhaalde blootstelling aan een stof tijdens de dracht op de moederdieren en de ontwikkeling van hun jongen in de uterus. De resultaten van het onderzoek moeten in samenhang met de resultaten van het onderzoek naar subchronische en reproductietoxiciteit alsmede toxicokinetisch en ander onderzoek worden geïnterpreteerd. Aangezien de nadruk ligt op zowel de algemene toxiciteit voor de moederdieren als de ontwikkelingstoxiciteit, zal met de resultaten van het onderzoek tot op zekere hoogte onderscheid kunnen worden gemaakt tussen effecten op de ontwikkeling zonder algemene toxiciteit en effecten die zich alleen voordoen bij niveaus die ook voor het moederdier toxisch zijn (27).

3 RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende specifieke informatie opgenomen :

Teststof :

- de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;
- de identiteit met vermelding van het CAS-nummer indien dit bekend/toegekend is;
- de zuiverheid.

Medium (indien van toepassing) :

- motivering voor de keuze van het medium, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren :

- gebruikte soort en stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden :

- beweegredenen voor de keuze van de dosisniveaus;
- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof c.q. de samenstelling van het voer, de concentratie en de stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- de leefomstandigheden;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Resultaten :

Gegevens over de toxische reacties bij de moederdieren per dosis, waaronder in elk geval maar niet uitsluitend :

- het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat aan het eind nog in leven is, het aantal drachtige dieren en het aantal dieren waarbij abortus of een voortijdige worp optreedt;
- de sterfdag van dieren die aan het eind van de test niet meer in leven zijn;
- de gegevens van dieren die niet meer in leven zijn op het tijdstip waarop ze zouden worden gedood, worden wel gerapporteerd maar niet in de statistische vergelijking tussen de groepen opgenomen;
- de dag waarop elk afwijkend klinisch verschijnsel wordt waargenomen en het verdere verloop daarvan;
- het lichaamsgewicht, de veranderingen in het lichaamsgewicht en het gewicht van de drachtige uterus, waarbij facultatief de veranderingen in het lichaamsgewicht voor het gewicht van de drachtige uterus kunnen worden gecorrigeerd;
- de voerconsumptie en, indien dit gemeten is, het watergebruik;
- de obductiebevindingen, met inbegrip van het gewicht van de uterus;
- de NOAEL-waarden voor de effecten op de moederdieren en op de ontwikkeling dienen te worden gerapporteerd.

Eindpunten voor ontwikkelingstoxiciteit per dosis voor nesten met implantaties, met inbegrip van :

- het aantal corpora lutea;
- het aantal implantaties en het aantal en percentage levende en dode foetussen en resorpties;
- het aantal en percentage verloren vruchten vóór en na implantatie.

Eindpunten voor ontwikkelingstoxiciteit per dosis voor nesten met levende foetussen, met inbegrip van :

- het aantal en percentage levende jongen;
- de verhouding mannetjes/vrouwtjes;
- het lichaamsgewicht van de foetussen, bij voorkeur per geslacht en voor mannetjes en vrouwtjes samen;
- externe misvormingen, misvormingen in de zachte weefsels en het skelet en andere relevante afwijkingen;
- de criteria voor indeling in categorieën, indien van toepassing;
- het totale aantal en het percentage foetussen en nesten met externe afwijkingen en afwijkingen in de zachte weefsels en het skelet, alsmede de aard en de frequentie van de verschillende anomalieën en andere relevante afwijkingen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4 REFERENTIES

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
- (2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350 : Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247 :367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47 :229-242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development : The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127 :291-306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats : Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.
- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology : Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In : *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Bijlage 1 G**« B.35. REPRODUCTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER TWEE GENERATIES****1 METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 416 (2001) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Deze testmethode voor de reproductietoxiciteit over twee generaties is bedoeld om algemene informatie te verschaffen over de effecten van een teststof op de toestand en het functioneren van het mannelijke en vrouwelijke reproductiesysteem, met inbegrip van de functie van de geslachtsorganen, de oestrus-cyclus, het paargedrag, de bevruchting, de zwangerschap, de geboorte, de lactatie en het spenen, en de groei en ontwikkeling van de nakomelingen. De studie kan ook informatie verschaffen over de effecten van de teststof op de neonatale morbiditeit en mortaliteit en voorlopige gegevens over de prenatale en postnatale ontwikkelingstoxiciteit en kan als leidraad voor verdere tests fungeren. Deze testmethode is niet alleen bedoeld om de groei en ontwikkeling van de F1-generatie te bestuderen, maar ook om de toestand en het functioneren van het mannelijke en vrouwelijke reproductiesysteem daarvan en de groei en ontwikkeling van de F2-generatie te beoordelen. Om meer informatie te verkrijgen over de ontwikkelingstoxiciteit en functionele gebreken kunnen aanvullende tests in dit protocol worden opgenomen, waarbij eventueel de methoden voor ontwikkelingstoxiciteit en/of ontwikkelingsneurotoxiciteit kunnen worden geraadpleegd, of kunnen deze eindpunten bij aparte onderzoeken met de daartoe geschikte testmethoden worden bestudeerd.

1.2 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in geleidelijk oplopende doseringen aan verschillende groepen mannetjes en vrouwtjes toegediend. De mannetjes van de P-generatie krijgen de teststof gedurende de groei en ten minste één volledige spermatogenese-cyclus toegediend (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat) om eventuele schadelijke effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen. De effecten op het sperma worden aan de hand van een aantal sperma-parameters (zoals de morfologie en beweeglijkheid van het sperma) en door weefselpreparatie en gedetailleerde histopathologie bepaald. Als er gegevens over de spermatogenese beschikbaar zijn uit een eerder uitgevoerd onderzoek met herhaalde toediening dat lang genoeg geduurd heeft, b.v. een onderzoek van 90 dagen, behoeven de mannetjes van de P-generatie niet in de evaluatie te worden opgenomen. Wel wordt echter aanbevolen monsters of opgenomen digitale beelden van sperma van de P-generatie te bewaren om een latere evaluatie mogelijk te maken. De vrouwtjes van de P-generatie krijgen de teststof gedurende de groei en enkele volledige oestrus-cycli toegediend om eventuele schadelijke effecten van de teststof op de normale oestrus-cyclus te detecteren. De teststof wordt gedurende de dekperiode, gedurende de daaruit voortvloeiende dracht en tot en met het spenen van hun F1-jongen aan de ouderdieren (P-generatie) toegediend. Bij het spenen van de F1-generatie wordt de toediening van de stof voortgezet bij de F1-jongen, en wel gedurende hun groei tot volwassenheid, de dekking en de productie van een F2-generatie tot de F2-generatie wordt gespeend.

Alle dieren worden klinisch geobserveerd en pathologisch onderzocht op toxiciteitsverschijnselen, waarbij vooral wordt gelet op effecten op de toestand en het functioneren van het mannelijke en vrouwelijke reproductiesysteem en de groei en ontwikkeling van de jongen.

1.3 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.3.1 Keuze van de diersoort**

Voor de test worden bij voorkeur ratten gebruikt. Als er een andere soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven en zullen er de nodige wijzigingen moeten worden aangebracht. Stammen met een lage vruchtbaarheid of waarvan bekend is dat er vaak ontwikkelingsstoornissen optreden, mogen niet worden gebruikt. Aan het begin van het onderzoek moeten de gewichtsverschillen tussen de dieren minimaal zijn en niet groter dan 20 % van het gemiddelde gewicht van elke sekse.

1.3.2 Huisvesting en voeding

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (\pm 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. De verlichting dient met kunstlicht te gebeuren met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende vermenging van de teststof te zorgen wanneer die langs deze weg wordt toegediend.

De dieren kunnen elk apart of in kleine groepjes met hetzelfde geslacht worden ondergebracht. De dekking gebeurt in daarvoor geschikte kooien. Wanneer de dekking blijkt te hebben plaatsgevonden, worden de vrouwtjes apart gezet in werp- of drachthokken. Dieren die gedekt zijn kunnen ook in groepjes worden gehuisvest en één of twee dagen voor het werpen apart worden gezet. Dieren die gedekt zijn krijgen geschikt en gespecificeerd nestmateriaal wanneer ze gaan werpen.

1.3.3 Voorbereiding van de dieren

Er worden gezonde jonge dieren gebruikt die gedurende ten minste 5 dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. De kenmerken van de proefdieren qua soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en/of leeftijd worden vastgelegd. Alle broer/zus-verhoudingen tussen de dieren moeten bekend zijn, zodat dekking van zus door broer wordt vermeden. De dieren worden aselekt ingedeeld in controlegroepen en behandelde groepen (waarbij geleding aan de hand van het lichaamsgewicht wordt aanbevolen). De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer. Bij de P-generatie gebeurt dit voordat de toediening begint. Bij de F1-generatie gebeurt dit bij het spenen voor de dieren die voor dekking worden geselecteerd. Voor alle geselecteerde F1-dieren wordt bijgehouden uit welk nest ze afkomstig zijn. Daarnaast wordt aanbevolen de jongen zo spoedig mogelijk na de geboorte een eigen identificatie te geven, wanneer wordt overwogen de jongen apart te wegen of functieproeven uit te voeren.

Wanneer met de toediening aan de ouderdieren (P-generatie) wordt gestart, dienen deze ongeveer 5-9 weken oud te zijn. De dieren van alle testgroepen dienen zo veel mogelijk hetzelfde gewicht en dezelfde leeftijd te hebben.

1.4 UITVOERING**1.4.1 Aantal en geslacht van de dieren**

Elke test- en controlegroep dient een zodanig aantal dieren te bevatten dat er bij voorkeur ten minste 20 drachtige vrouwtjes op of vlak voor de werpdatum zijn. Bij stoffen die ongewenste aan de behandeling gerelateerde effecten veroorzaken (b.v. steriliteit of te grote toxiciteit bij hoge doses), is dit soms onmogelijk. Het is de bedoeling dat er genoeg drachtige vrouwtjes zijn om een zinnige beoordeling mogelijk te maken van het vermogen van de stof om

invloed te hebben op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder, het zogen, de groei en ontwikkeling van de F1-generatie vanaf de bevruchting tot aan de geslachtsrijpheid en de ontwikkeling van hun jongen (de F2-generatie) tot ze gespeend worden. Als het gewenste aantal drachtige dieren (d.w.z. 20) niet kan worden gehaald, betekent dit niet automatisch dat het onderzoek onbruikbaar is; dit moet van geval tot geval worden beoordeeld.

1.4.2 Bereiding van de doses

De teststof wordt bij voorkeur oraal (in het voer, in het drinkwater of met een sonde) toegediend, tenzij een andere toedieningsweg (b.v. dermaal of door inhalatie) geschikter wordt geacht.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenseerd. Aanbevolen wordt eerst te bezien of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/emulsie in olie (b.v. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. De stabiliteit van de teststof in het medium moet worden bepaald.

1.4.3 Dosering

Er worden ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controlegroep gebruikt. Tenzij dit vanwege de fysisch/chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, moet de hoogste dosis zodanig worden gekozen dat er enige toxiciteit wordt veroorzaakt, maar geen sterfte of ernstig leed. Bij onverwachte sterfte zijn onderzoeken met een sterfte van minder dan ongeveer 10 % bij de ouderdieren (de P-generatie) normaal gesproken nog aanvaardbaar. Er wordt een dalende reeks dosisniveaus gekozen teneinde een dosis-afhankelijk effect en de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten (NOAEL) te bepalen. Intervallen van een factor twee of vier zijn vaak optimaal om de dalende dosisniveaus vast te stellen en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (b.v. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken. Bij toediening in het voer mag het dosis-interval niet meer dan een factor drie zijn. Bij de keuze van de dosisniveaus wordt rekening gehouden met bekende toxiciteitsgegevens, met name resultaten van onderzoek met herhaalde toediening. Ook met beschikbare gegevens over het metabolisme en de kinetiek van de teststof of verwante verbindingen dient rekening te worden gehouden. Bovendien zal met deze informatie ook makkelijker kunnen worden aangetoond dat het doseringsschema adequaat is.

De controlegroep wordt niet of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, met medium behandeld. Afgezien van de toediening van de teststof is de behandeling van de dieren in de controlegroep identiek aan die van de dieren in de testgroepen. Als er een medium wordt gebruikt, wordt aan de controlegroep de hoogste gebruikte medium-dosis toegediend. Als een teststof in het voer wordt toegediend en leidt tot een lagere voeropname of voerbenutting, kan het gebruik van een paarsgewijs gevoerde controlegroep nodig worden geacht. In plaats van een gelijktijdige paarsgewijs gevoerde controlegroep kunnen ook gegevens worden gebruikt uit gecontroleerd onderzoek dat is opgezet om de effecten van een lagere voerconsumptie op reproductie-parameters te bepalen.

Er moet aandacht worden geschonken aan de volgende kenmerken van het medium en andere additieven: effecten op de resorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof, effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken daarvan kunnen wijzigen en effecten op het voer- of watergebruik of de voedingstoestand van de dieren.

1.4.4 Limiettest

Als een onderzoek met orale toediening van één dosis van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag of, bij toediening in het voer of het drinkwater, een equivalent percentage in het voer of drinkwater volgens de voor dit onderzoek beschreven procedure geen waarneembare toxiciteit bij de ouderdieren of hun jongen veroorzaakt en op grond van gegevens over verwante verbindingen qua structuur en/of metabolisme geen toxiciteit te verwachten valt, zal een volledig onderzoek met verschillende dosisniveaus wellicht niet nodig zijn. De limiettest is bruikbaar, behalve wanneer vanwege de verwachte blootstelling van de mens een hogere orale dosis nodig wordt geacht. Voor andere toedieningsvormen, zoals inhalatie of toediening op de huid, zal het maximaal haalbare blootstellingsniveau vaak worden bepaald en beperkt door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof zoals de oplosbaarheid.

1.4.5 Toediening van de doses

De teststof wordt 7 dagen per week aan de dieren toegediend. Bij voorkeur wordt voor de orale toedieningsweg (in het voer, in het drinkwater of met een sonde) gekozen. Als er een andere toedieningsweg wordt gebruikt, moet er een motivering worden gegeven en kunnen er aanpassingen nodig zijn. De stof wordt aan alle dieren gedurende de vereiste proefperiode met dezelfde methode toegediend. Als de stof met een sonde wordt toegediend, moet dit met een maagsonde gebeuren. Het volume vloeistof dat in één keer wordt toegediend, mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht (voor maïsolie is het maximum 0,4 ml/100 g lichaamsgewicht), behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat; in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Behalve wanneer het om irriterende of bijtende stoffen gaat, waarbij meestal bij hogere concentraties heviger effecten optreden, worden variaties in het toegediende volume tot een minimum beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er voor alle dosisniveaus een constant volume wordt toegediend. Bij sondetoediening krijgen de jongen de teststof meestal alleen indirect via de melk, totdat ze worden gespeend en directe toediening begint. Bij toediening in het voer of het drinkwater krijgen de jongen de teststof ook direct binnen wanneer ze in de laatste week van de lactatieperiode zelf beginnen te eten.

Wanneer stoffen via het voer of het drinkwater worden toegediend, is het belangrijk ervoor te zorgen dat de hoeveelheid teststof de normale voedings- of waterbalans niet stoort. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante voerconcentratie (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier worden gebruikt. De gekozen methode dient te worden vermeld. Wanneer de stof met een sonde wordt toegediend, gebeurt dit elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip en wordt de dosis ten minste een keer per week aangepast om een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht te houden. Wanneer de met een sonde toegediende dosis op basis van het gewicht wordt aangepast, moet rekening worden gehouden met informatie over de placenta-verdeling.

1.4.6 Testschema's

De dagelijkse toediening aan de ouderdieren (de mannetjes en vrouwtjes van de P-generatie) begint wanneer ze 5 tot 9 weken oud zijn. De dagelijkse toediening aan de mannetjes en vrouwtjes van de F1-generatie begint wanneer ze worden gespeend; er moet aan worden gedacht dat de directe blootstelling van de F1-jongen bij toediening van de teststof via het voer of het drinkwater al tijdens de lactatieperiode kan beginnen. Voor beide geslachten (P en F1) vindt de toediening ten minste 10 weken vóór de dekperiode plaats. Voor beide geslachten wordt de toediening gedurende de dekperiode van twee weken voortgezet. De mannetjes worden op humane wijze gedood en onderzocht wanneer ze niet meer nodig zijn voor de bepaling van de effecten op de reproductie. Bij de moederdieren (P-generatie) wordt de toediening gedurende de dracht en tot het spenen van de F1-jongen voortgezet. Op basis van de beschikbare informatie over de teststof, bijvoorbeeld over de toxiciteit, de metabolisme-inductie of de bioaccumulatie, moet worden

overwogen of er wijzigingen in het toedieningsschema nodig zijn. De dosis voor een bepaald dier wordt normaal gesproken gebaseerd op de meest recente bepaling van het lichaamsgewicht. Bij de aanpassing van de dosis gedurende het laatste derde deel van de dracht moet echter zorgvuldigheid worden betracht.

De mannetjes en vrouwtjes van de P- en de F1-generatie worden behandeld tot ze worden gedood. Alle volwassen mannetjes en vrouwtjes van de P- en de F1-generatie worden op humane wijze gedood wanneer ze niet meer nodig zijn voor de bepaling van de effecten op de reproductie. De F1-jongen die niet voor dekking worden geselecteerd en alle F2-jongen worden na het spenen op humane wijze gedood.

1.4.7 De dekprocedure

1.4.7.1 Dekking bij de ouderdieren (P-generatie)

Voor elke dekking wordt één vrouwtje bij één mannetje van dezelfde dosisgroep gezet (1 : 1-dekking) totdat ze copuleren of er twee weken zijn verstreken. Elke dag worden de vrouwtjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of een vaginale prop. Als dag 0 van de dracht geldt de dag waarop een vaginale prop of sperma wordt gevonden. Wanneer de dekking geen succes heeft, kan worden overwogen de vrouwtjes opnieuw te laten dekken door mannetjes van dezelfde groep waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond. In de gegevens wordt duidelijk vermeld welke dieren gepaard hebben. Dekking door een mannetje met dezelfde ouders wordt vermeden.

1.4.7.2 Dekking bij de F1-generatie

Voor de dekking van de F1-jongen worden uit elk nest bij het spenen ten minste één mannetje en één vrouwtje gekozen om te paren met andere jongen van hetzelfde dosisniveau maar een ander nest, hetgeen de F2-generatie oplevert. Wanneer er tussen de jongen uit één nest geen significante verschillen in lichaamsgewicht of uiterlijk worden waargenomen, worden de jongen aselekt gekozen. Wanneer deze verschillen wel worden waargenomen, worden de beste vertegenwoordigers van elk nest gekozen. In de praktijk gebeurt dit het gemakkelijkst op basis van het lichaamsgewicht, maar het kan beter zijn om het op basis van het uiterlijk te doen. De dekking bij de F1-generatie gebeurt niet voordat ze volledig tot geslachtsrijpheid zijn gekomen.

Paren zonder jongen worden beoordeeld om te bepalen wat de oorzaak van de onvruchtbaarheid lijkt te zijn. Daartoe kan de gelegenheid worden gegeven voor paringen met andere mannetjes of vrouwtjes waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond, kunnen de voortplantingsorganen microscopisch worden onderzocht en kan de oestrus-cyclus of de spermatogenese nader worden onderzocht.

1.4.7.3 Tweede dekking

In bepaalde gevallen, bijvoorbeeld bij aan de behandeling gerelateerde veranderingen in de nestgrootte of bij de waarneming van een twijfelachtig effect bij de eerste dekking, wordt aanbevolen de volwassen P- en F1-dieren opnieuw te laten paren om een tweede nest te krijgen. Daarbij wordt aanbevolen vrouwtjes of mannetjes die geen nest hebben gekregen te laten paren met dieren van het andere geslacht waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond. Als in een van beide generaties een tweede nest nodig wordt geacht, laat men de dieren ongeveer een week na het spenen van het laatste nest opnieuw paren.

1.4.7.4 Nestgrootte

De dieren krijgen de gelegenheid hun jongen normaal te werpen en groot te brengen tot ze worden gespeend. Standaardisatie van de nestgrootte is facultatief. Wanneer standaardisatie gebeurt, moet de gebruikte methode gedetailleerd worden beschreven.

1.5 WAARNEMINGEN

1.5.1 Klinische observaties

Elke dag wordt een algemene klinische observatie uitgevoerd en bij sondetoediening wordt voor het tijdstip rekening gehouden met de periode na de toediening waarin maximale effecten worden verwacht. Gedragsveranderingen, tekenen dat het werpen moeilijk verloopt of langer duurt en alle toxiciteitsverschijnselen worden geregistreerd. Ten minste één maal per week wordt daarnaast een gedetailleerder onderzoek van elk dier uitgevoerd; dit kan gemakkelijk gebeuren wanneer het dier wordt gewogen. Twee maal per dag en in het weekend eventueel één maal per dag wordt bij alle dieren naar ziekte of sterfte gekeken.

1.5.2 Lichaamsgewicht en voer/waterconsumptie van de ouderdieren

De ouderdieren (P- en F1-generatie) worden op de eerste dag van toediening en vervolgens ten minste één maal per week gewogen. De moederdieren (P- en F1-generatie) worden ten minste op de dagen 0, 7, 14 en 20 of 21 van de dracht gewogen en tijdens de lactatieperiode op de dagen waarop de nesten worden gewogen en op de dag waarop de dieren worden gedood. Deze observaties worden voor elk volwassen dier apart gerapporteerd. In de periode vóór de dekking en tijdens de dracht wordt de voerconsumptie ten minste wekelijks gemeten. Het watergebruik wordt ten minste wekelijks gemeten als de teststof in het water wordt toegediend.

1.5.3 De oestrus-cyclus

Bij de vrouwtjes van de P- en de F1-generatie worden de lengte en de normaliteit van de oestrus-cyclus geëvalueerd door vaginale uitstrijkjes vóór de dekking en facultatief tijdens de dekking totdat kan worden aangetoond dat de dekking heeft plaatsgevonden. Bij het verwijderen van cellen van de vagina/cervix moet ervoor worden gezorgd dat verstoring van de mucosa en daardoor schijnzwangerschap worden voorkomen (1).

1.5.4 Sperma-parameters

Van alle mannetjes van de P- en de F1-generatie wordt, wanneer ze worden gedood, het gewicht van de testis en de epididymis geregistreerd en wordt één exemplaar van elk orgaan bewaard voor histopathologisch onderzoek (zie de punten 1.5.7. en 1.5.8.1). Van een subgroep van ten minste tien mannetjes van elke groep P- en F1-mannetjes worden de andere testis en epididymis gebruikt voor de telling van respectievelijk de homogenisatie-resistente spermatiden en de spermareserve in de staart van de epididymis. Bij deze zelfde subgroep wordt sperma uit de staart van de epididymis of het vas deferens verzameld om de beweeglijkheid en de morfologie van het sperma te beoordelen. Als er aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen of uit andere onderzoeken is gebleken dat effecten op de spermatogenese mogelijk zijn, wordt de beoordeling van het sperma bij alle mannetjes van elke dosisgroep uitgevoerd; in andere gevallen kan de telling worden beperkt tot de P- en F1-mannetjes uit de controlegroep en de groep met de hoogste dosis.

Het totale aantal homogenisatie-resistente spermatiden uit de testis en het sperma in de staart van de epididymis worden geteld (2) (3). De spermareserve in de staart kan worden afgeleid uit de concentratie en het volume van het sperma in de suspensie die voor de kwalitatieve beoordeling wordt gebruikt en het aantal spermatozoën dat later door het resterende staartweefsel fijn te malen en/of te homogeniseren wordt gevonden. De telling gebeurt direct na het doden van de dieren bij de gekozen subgroep van de mannetjes van alle dosisgroepen, tenzij er video- of digitale beelden worden gemaakt of tenzij de exemplaren worden ingevroren en later worden geanalyseerd. In deze gevallen

kunnen de controlegroep en de groep met de hoogste dosis als eerste worden geanalyseerd. Als er geen aan de behandeling gerelateerde effecten (b.v. effecten op het aantal spermatozoën, op de beweeglijkheid of op de morfologie) worden waargenomen, behoeven de andere dosisgroepen niet te worden geanalyseerd. Wanneer bij de groep met de hoogste dosis wel aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen, moeten de groepen met een lagere dosis ook worden beoordeeld.

De beweeglijkheid van sperma uit de epididymis (of het ductus deferens) wordt onmiddellijk na het doden beoordeeld of op video opgenomen. Het sperma wordt verwijderd, waarbij de beschadiging tot het minimum wordt beperkt, en met aanvaardbare methoden verdund voor de beweeglijkheidsanalyse (4). Het percentage spermatozoën in oplopende beweeglijkheidscategorieën wordt subjectief of objectief bepaald. Wanneer computer-gesteunde bewegingsanalyse wordt gebruikt (5) (6) (7) (8) (9) (10), worden de oplopende beweeglijkheidscategorieën bepaald door drempelwaarden voor de gemiddelde snelheid en rechttheid van het pad of een lineaire index die door de gebruiker worden bepaald. Als bij obductie de monsters op video worden opgenomen (11) of de beelden op een andere wijze worden vastgelegd, kan later een analyse van alleen de P- en F1-mannetjes van de controlegroep en de groep met de hoogste dosis worden uitgevoerd, tenzij er aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen; in dat geval moeten de groepen met een lagere dosis ook worden beoordeeld. Wanneer er geen video- of digitale beelden worden opgenomen, worden alle monsters in alle behandelingsgroepen bij de obductie geanalyseerd.

Er wordt een morfologische evaluatie van een spermamonster uit de epididymis (of het vas deferens) uitgevoerd. De spermatozoën (ten minste 200 per monster) worden als gefixeerde natte preparaten onderzocht (12) en als normaal of abnormaal ingedeeld. Morfologische abnormaliteiten van sperma zijn bijvoorbeeld versmelting, geïsoleerde koppen of misvormde koppen en/of staarten. De evaluatie wordt bij de geselecteerde subgroep mannetjes van alle dosisgroepen direct na het doden van de dieren of, wanneer er video- of digitale beelden worden opgenomen, op een later tijdstip uitgevoerd. Ook uitstrijkjes kunnen, wanneer ze gefixeerd zijn, later worden afgelezen. In deze gevallen kunnen de controlegroep en de groep met de hoogste dosis als eerste worden geanalyseerd. Als er geen aan de behandeling gerelateerde effecten (b.v. effecten op de morfologie van het sperma) worden waargenomen, behoeven de andere dosisgroepen niet te worden geanalyseerd. Wanneer bij de groep met de hoogste dosis wel aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen, moeten de groepen met een lagere dosis ook worden beoordeeld.

Als een van de bovengenoemde parameters voor de sperma-evaluatie al eerder als onderdeel van een onderzoek naar systemische toxiciteit van ten minste 90 dagen is onderzocht, hoeft deze bij het onderzoek over twee generaties niet noodzakelijkerwijs opnieuw te worden onderzocht. Wel wordt echter aanbevolen monsters of digitale beelden van het sperma van de P-generatie te bewaren om eventueel een latere evaluatie mogelijk te maken.

1.5.5 Jongen

Elk nest wordt zo spoedig mogelijk na het werpen (lactatiedag 0) onderzocht om het aantal en het geslacht van de jongen, de doodgeboren jongen en de levend geboren jongen en de aanwezigheid van macroscopische afwijkingen vast te stellen. Jongen die op dag 0 dood worden aangetroffen worden, als ze niet verweekt zijn, bij voorkeur onderzocht op mogelijke gebreken en de doodsoorzaak en geconserveerd. Levende jongen worden bij de geboorte (lactatiedag 0) of op dag 1 en vervolgens periodiek op weegdagen, zoals bijvoorbeeld de dagen 4, 7, 14 en 21 van de lactatie, geteld en apart gewogen. Bij de moederdieren of de jongen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen worden geregistreerd.

De lichamelijke ontwikkeling van de jongen wordt voornamelijk door de toename van het lichaamsgewicht geregistreerd. Andere lichamelijke parameters (zoals de oor- en oogopening, het doorkomen van tanden en de haargroei) kunnen aanvullende informatie opleveren, maar deze gegevens dienen bij voorkeur te worden beoordeeld in de context van gegevens over de geslachtelijke rijping (zoals leeftijd en lichaamsgewicht bij de opening van de vagina of de scheiding tussen eikel en voorhuid) (13). Functioneel onderzoek (b.v. motorische activiteit, sensorische functie of reflex-ontogenie) bij de jongen van de F1-generatie voor en/of na het spenen, met name in verband met geslachtelijke rijping, wordt aanbevolen als dergelijk onderzoek niet in afzonderlijke studies is opgenomen. Bij gespeende jongen van de F1-generatie die voor dekking worden geselecteerd, wordt de leeftijd bij de opening van de vagina of de scheiding van de voorhuid bepaald. De anaal-genitale afstand wordt bij jongen van de F2-generatie op dag 0 na het werpen gemeten als dit in verband met wijzigingen in de verhouding mannetjes/vrouwjes of het tijdstip van geslachtelijke rijping bij de F1-generatie wenselijk wordt geacht.

Functioneel onderzoek kan achterwege worden gelaten bij groepen met andere duidelijke tekenen van schadelijke effecten (zoals een significante daling van de gewichtstoename). Als functioneel onderzoek wordt uitgevoerd, moet dit niet gebeuren bij de jongen die voor dekking worden geselecteerd.

1.5.6 Macroscopische obductie

Alle ouderdieren (P- en F1-generatie), alle jongen met uiterlijke afwijkingen of klinische verschijnselen en één aselekt gekozen jong/geslacht/nest van zowel de F1- als de F2-generatie worden, wanneer ze worden gedood of tijdens het onderzoek sterven, macroscopisch onderzocht op structurele afwijkingen of pathologische veranderingen. Daarbij wordt speciale aandacht besteed aan de organen van het reproductiesysteem. Jongen die op humane wijze zijn gedood omdat ze stervend waren en dode jongen (wanneer ze niet verweekt zijn) worden onderzocht op mogelijke gebreken en/of de doodsoorzaak en geconserveerd.

Bij alle vrouwjes die voor het eerst een nest werpen wordt de uterus op een zodanige wijze onderzocht op de aanwezigheid van en het aantal implantatieplaatsen dat geen afbreuk wordt gedaan aan het histopathologische onderzoek.

1.5.7 Gewicht van de organen

Van alle ouderdieren van de P- en F1-generatie worden, wanneer ze worden gedood, het lichaamsgewicht en het gewicht van de volgende organen bepaald (organen die paarsgewijs voorkomen worden apart gewogen) :

- de uterus en de eierstokken;
- de testes en de epididymen (totaal en staart);
- de prostaat;
- de zaadblaasjes met de coagulatieklieren en hun vloeistof en de prostaat (als één geheel);
- de hersenen, de lever, de nieren, de milt, de hypofyse, de schildklier, de bijnieren en bekende doelorganen.

Bij de jongen van de F1- en de F2-generatie die voor obductie zijn geselecteerd, wordt het uiteindelijke lichaamsgewicht bepaald en van één aselekt gekozen jong/geslacht/nest (zie punt 1.5.6) worden de volgende organen gewogen : hersenen, milt en thymus.

De resultaten van de macroscopische obductie en het wegen van de organen worden indien mogelijk beoordeeld in de context van waarnemingen bij andere onderzoeken met herhaalde toediening.

1.5.8 Histopathologie

1.5.8.1 Ouderdieren

De volgende organen en weefsels van de ouderdieren (P- en F1-generatie) of representatieve monsters daarvan worden in een geschikt medium gefixeerd en bewaard voor histopathologisch onderzoek :

- de vagina, de uterus met de cervix en de eierstokken (geconserveerd in een geschikt fixatief);
- één testis (geconserveerd in Bouin's of een vergelijkbaar fixatief), één epididymis, de zaadblaasjes, de prostaat en de coagulatieklier;
- eerder gespecificeerde doelorganen uit alle dieren van de P- en de F1-generatie die voor dekking zijn geselecteerd.

Bij alle bovengenoemde geconserveerde organen en weefsels wordt voor alle P- en F1-dieren van de controlegroep en de groep met de hoogste dosis die voor dekking zijn geselecteerd, een volledig histopathologisch onderzoek uitgevoerd. Een onderzoek van de eierstokken van de P-dieren is facultatief. Organen waarin aan de behandeling gerelateerde wijzigingen worden aangetoond, worden ook in de groepen met een lagere dosis onderzocht om bij te dragen tot de bepaling van de NOAEL. Daarnaast worden de voortplantingsorganen van de dieren uit de groepen met een lagere dosis waarbij een verminderde vruchtbaarheid wordt vermoed, bijvoorbeeld degene die in gebreke zijn gebleven bij de dekking, de bevruchting of het werpen van gezonde jongen of waarvoor de periodiciteit van de oestrus of het aantal, de beweeglijkheid of de morfologie van de spermatozoën is aangetast, histopathologisch onderzocht. Alle macroscopische letsels zoals atrofie of tumoren worden onderzocht.

Er wordt uitgebreid histopathologisch onderzoek van de testis uitgevoerd (b.v. met Bouin's fixatief, inbedding met paraffine en dwarscoupes met een dikte van 4-5 µm) om aan de behandeling gerelateerde effecten te signaleren, zoals achtergebleven spermata, ontbrekende kiemcellen of -soorten, meerkernige reuzencellen of spermatogene cellen die in het lumen terecht komen (14). Het onderzoek van de intacte epididymis omvat de kop, het lichaam en de staart en dit kan gebeuren door een lengtecoupe te onderzoeken. De epididymis wordt onderzocht op infiltratie van leukocyten, wijzigingen in het voorkomen van celtypen, afwijkende celtypen en fagocytose van spermatozoën. Voor het onderzoek van de mannelijke voortplantingsorganen kan kleuring met PAS en hematoxyline worden gebruikt.

De eierstok na de lactatieperiode moet primaire en groeiende follikels en de grote corpora lutea van de lactatie bevatten. Bij histopathologisch onderzoek moet een kwalitatieve depletie van de primaire follikelpopulatie worden waargenomen. Voor de F1-vrouwtjes wordt een kwantitatieve evaluatie van de primaire follikels uitgevoerd; het aantal dieren, de keuze van de coupe van de eierstok en de monstergrootte van de coupe moeten in statistisch opzicht adequaat zijn voor de gebruikte evaluatieprocedure. Bij het onderzoek wordt het aantal primaire follikels geteld en dit kan worden gecombineerd met het aantal kleine groeiende follikels om de behandelde en de controle-eierstokken te vergelijken (15) (16) (17) (18) (19).

1.5.8.2 Gespeende dieren

Macroscopisch abnormale weefsels en doelorganen van alle jongen met uitwendige afwijkingen of klinische verschijnselen en van het ene aselekt gekozen jong/geslacht/nest uit zowel de F1- als de F2-generatie die niet voor dekking zijn geselecteerd, worden in een geschikt medium gefixeerd en bewaard voor histopathologisch onderzoek. Van de geconserveerde weefsels wordt een volledige histopathologische karakterisering uitgevoerd, waarbij de nadruk vooral ligt op de organen van het reproductiesysteem.

2 GEGEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden individueel gerapporteerd met een overzicht in tabelvorm, waarbij voor elke testgroep en elke generatie worden vermeld : het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met het oog op een humane behandeling is gedood, het tijdstip van sterfte of humane doding, het aantal vruchtbare dieren, het aantal drachtige vrouwtjes, het aantal dieren met toxiciteitsverschijnselen, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen met vermelding van de aanvang, de duur en de ernst van de toxische effecten, de aard van de waarnemingen bij de ouderdieren en de jongen, de aard van de histopathologische veranderingen en alle relevante gegevens over de nesten.

De getalsmatige resultaten worden met een geschikte algemeen aanvaarde statistische methode geëvalueerd; de statistische methoden worden bij de opzet van het onderzoek gekozen en gemotiveerd. Statistische dosis/responsmodellen kunnen nuttig zijn voor de analyse van de gegevens. In het verslag wordt voldoende informatie over de analysemethode en het gebruikte computerprogramma vermeld, zodat een onafhankelijke evaluator/statisticus de analyse kan beoordelen en reconstrueren.

2.2 EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van dit reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties worden aan de hand van de waargenomen effecten, zoals de resultaten van de obductie en microscopisch onderzoek, beoordeeld. De beoordeling omvat het verband, of het ontbreken daarvan, tussen de dosis van de teststof en de aanwezigheid of afwezigheid, de frequentie en de ernst van abnormaliteiten zoals macroscopisch letsel, gespecificeerde doelorganen, verminderde vruchtbaarheid, klinische abnormaliteiten, aantasting van de reproductie- en nestresultaten, veranderingen in het lichaamsgewicht, effecten op de mortaliteit en andere toxische effecten. Bij de beoordeling van de testresultaten wordt rekening gehouden met de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof en, wanneer deze beschikbaar zijn, gegevens over de toxicokinetiek.

Een adequaat uitgevoerd reproductietoxiciteitsonderzoek levert een bevredigende raming van een dosis zonder effect op en een inzicht in schadelijke effecten op de reproductie, de geboorte, de lactatie en de postnatale ontwikkeling met inbegrip van de groei en de geslachtelijke ontwikkeling.

2.3 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Een reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties levert informatie op over de effecten van herhaalde blootstelling aan een stof gedurende alle fasen van de reproductiecyclus. Het onderzoek levert met name informatie op over de reproductieparameters en over de ontwikkeling, de groei, de rijping en het overleven van de jongen. De resultaten van het onderzoek moeten in samenhang met de resultaten van het onderzoek naar subchronische en prenatale ontwikkelingstoxiciteit alsmede toxicokinetisch en ander beschikbaar onderzoek worden geïnterpreteerd. De resultaten van dit onderzoek kunnen worden gebruikt bij de evaluatie van de noodzaak om een chemische stof nader te onderzoeken. De resultaten van het onderzoek kunnen in beperkte mate naar de mens worden geëxtrapoleerd. Ze kunnen het best worden gebruikt voor informatie over de doses zonder effect en de toelaatbare blootstelling van de mens (20) (21) (22) (23).

3 RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen :

Teststof :

- de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;
- identificatiegegevens;
- de zuiverheid.

Medium (indien van toepassing) :

- motivering voor de keuze van het medium, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren :

- gebruikte soort en stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding, nestmateriaal enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden :

- beweegredenen voor de keuze van de dosisniveaus;
- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof c.q. de samenstelling van het voer en de concentratie;
- de stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Resultaten :

- de voerconsumptie en indien beschikbaar de waterconsumptie, het voerrendement (de toename van het lichaamsgewicht per gram geconsumeerd voer) en de consumptie van testmateriaal voor de P- en F1-dieren, behalve gedurende de periode dat ze samen in één hok zitten en gedurende ten minste het laatste derde deel van de lactatie;
- resorptiegegevens (indien beschikbaar);
- gegevens over het lichaamsgewicht voor de P- en F1-dieren die voor dekking zijn geselecteerd;
- gegevens over het gewicht van het nest en de jongen;
- het lichaamsgewicht bij het doden van de dieren en gegevens over het absolute en relatieve gewicht van organen voor de ouderdieren;
- de aard, de ernst en de duur van (al dan niet reversibele) klinische waarnemingen;
- de sterftijd van dieren die tijdens het onderzoek gestorven zijn;
- gegevens over de toxische reacties per geslacht en dosis, met inbegrip van indexen voor de dekking, de vruchtbaarheid, de dracht, de geboorte, de levensvatbaarheid en de lactatie; in het verslag worden ook de getallen vermeld die bij de berekening van deze indexen zijn gebruikt;
- toxische of andere effecten op de reproductie, de jongen, de postnatale groei enz.;
- de obductiebevindingen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- het aantal P- en F1-vrouwtjes met een normale cyclus en de lengte van de cyclus;
- het totale aantal spermatozoën in de staart van de epididymis, het percentage spermatozoën in oplopende beweeglijkheidscategorieën, het percentage morfologisch normale spermatozoën en het percentage spermatozoën met elke gespecificeerde abnormaliteit;
- de tijd tot dekking, met inbegrip van het aantal dagen tot de dekking;
- de duur van de dracht;
- het aantal implantaties, het aantal corpora lutea en de nestgrootte;
- het aantal levend geboren jongen en verliezen na implantatie;
- het aantal jongen met macroscopisch zichtbare abnormaliteiten; indien dit is bepaald, wordt het aantal ondermaatse jongen gerapporteerd;
- gegevens over ijkpunten in de lichamelijke ontwikkeling van de jongen en andere gegevens over de postnatale ontwikkeling; voor de geëvalueerde ijkpunten dient een motivering te worden gegeven;
- gegevens over functionele observaties bij jongen en volwassen dieren, indien van toepassing;
- een statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies, met inbegrip van de NOAEL-waarden voor de effecten op de moederdieren en de jongen.

4 REFERENTIES

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In : *Reproduction in Mammals : I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12 :92-108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54 :103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5 :39-44
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog : a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3) :237- 244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6 :267-273
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats : an In Vitro Demonstration. *Journal of Andrology* 13 :409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis : Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5 :449-458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In : *Methods in Toxicology, Part A.*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration : Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10 : 401-415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8 :330-337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6 :491-505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17 :298303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In : *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
- (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In : *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5 :379-383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In : *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In : *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity : A Risk Assessment Approach. In : *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In : *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK

Bijlage 1 H**« B.42.HUIDSENSIBILISATIE : LOKALE LYMFKLIERTEST****1 METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 429 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

De lokale lymfkliertest (LLKT) is afdoende gevalideerd en geaccepteerd om als nieuwe methode te kunnen worden ingevoerd (1) (2) (3). Dit is de tweede methode om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen bij dieren te bepalen. Bij de andere methode (B.6) worden cavia's gebruikt : de maximalisatietest en de Buehlertest (4).

De LLKT is een alternatief dat kan worden gebruikt om huidsensibilisatie door chemische stoffen te signaleren en om te bevestigen dat een chemische stof geen significant vermogen bezit om huidsensibilisatie te veroorzaken. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT in alle gevallen in plaats van de proef met cavia's moet worden gebruikt, maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd.

De LLKT biedt ten aanzien van zowel de wetenschappelijke vooruitgang als het dierenwelzijn bepaalde voordelen. Hij bestudeert de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens op die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validatie van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (5) (6) (7) (8). Daarnaast moet worden opgemerkt dat de milde/gematigde sensibilisatoren, die worden aanbevolen als geschikte stoffen voor positieve controle bij tests met cavia's, ook geschikt zijn om bij de LLKT te worden gebruikt (6) (8) (9).

De LLKT is een *in vivo* methode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van contactsensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Het is echter wel mogelijk dat het aantal daarvoor gebruikte dieren wordt beperkt. Bovendien zorgt de LLKT voor een aanzienlijke verfijning van de manier waarop dieren voor het testen op contactsensibilisatie worden gebruikt. De LLKT is gebaseerd op het onderzoek van immunologische gebeurtenissen die tijdens de inductiefase van sensibilisatie door chemische stoffen worden gestimuleerd. In tegenstelling tot de proeven met cavia's behoeven bij de LLKT geen door provocatie geïnduceerde overgevoeligheidsreacties van de huid te worden opgewekt. Bovendien hoeft bij de LLKT geen adjuvans te worden gebruikt, hetgeen bij de maximalisatietest bij cavia's wel nodig is. Dit betekent dat het ongerief voor dieren bij de LLKT geringer is. Ondanks de voordelen van de LLKT ten opzichte van klassieke proeven met cavia's moet worden gesteld dat er bepaalde beperkingen zijn waardoor het gebruik van klassieke proeven met cavia's nodig kan zijn (zoals vals-negatieve resultaten bij de LLKT met bepaalde metalen of vals-positieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren) (10).

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Het beginsel dat aan de LLKT ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren induceren tot een primaire proliferatie van lymfocyten in de lymfklier die de afvoer verzorgt van de plaats waar de stof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de aangebrachte dosis (en de potentie van het allergeen) en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een objectieve kwantitatieve meting van de sensibilisatie uit te voeren. De LLKT bepaalt deze proliferatie als een dosis/responsrelatie waarbij de proliferatie in de testgroepen wordt vergeleken met de proliferatie in met medium behandelde controlegroepen. De verhouding tussen de proliferatie bij behandelde groepen en bij de mediumcontrolegroepen wordt bepaald en deze z.g. stimuleringsindex moet minimaal drie zijn voordat een teststof nader kan worden beoordeeld als potentiële huidsensibilisator. De hier beschreven methoden zijn gebaseerd op het gebruik van radioactieve labeling voor de meting van celproliferatie. Er kunnen echter ook andere eindpunten voor de bepaling van de proliferatie worden gebruikt, mits daar een motivering en afdoende wetenschappelijke onderbouwing voor wordt gegeven met volledige referenties en een beschrijving van de methodologie.

1.3 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.3.1 Voorbereiding****1.3.1.1 Huisvesting en voeding**

De dieren worden in aparte kooien gehuisvest. De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

1.3.1.2 Voorbereiding van de dieren

De dieren worden aseptic ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

1.3.2 Testomstandigheden**1.3.2.1 Proefdieren**

Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen van de CBA/Ca- of CBA/J-stam gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-12 weken oud zijn; het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT-respons zijn.

1.3.2.2 Betrouwbaarheidscontrole

Er worden positieve controles gebruikt om aan te tonen dat de test goed is uitgevoerd en dat het laboratorium in staat is de test tot een goed einde te brengen. De positieve controle moet een positieve LLKT-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep een stijging van de stimuleringsindex (SI) met > 3 wordt verwacht. De dosis van de positieve controle moet zodanig worden gekozen dat de inductie duidelijk maar niet buitensporig is. De stoffen hexylcinnamaldehyd (CAS-nr. 101-86-0, EINECS-nr. 202-983-3) en mercaptobenzothiazool (CAS-nr. 149-30-4, EINECS-nr. 205-736-8) verdienen de voorkeur. Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere controlestoffen worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven. Normaal gesproken zal er voor elke bepaling een positieve controlegroep nodig zijn, maar in bepaalde situaties kunnen testlaboratoria beschikken over historische gegevens van positieve controles waaruit blijkt dat er gedurende een periode van zes maanden of langer consequent sprake is van een bevredigende respons. In dergelijke

gevallen kan worden volstaan met minder frequente tests met een positieve controle met een interval van ten hoogste zes maanden. Hoewel de stof voor de positieve controle moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (zoals aceton of olijfolie), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd. In dat geval moet worden onderzocht of er mogelijk sprake is van een interactie tussen de positieve controle en dit ongebruikelijke medium.

1.3.2.3 Aantal dieren, dosisniveaus en keuze van het medium

Er worden minimaal vier dieren per dosisgroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een negatieve controlegroep, die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en eventueel een positieve controlegroep. Wanneer de gegevens van elk dier afzonderlijk moeten worden verzameld, worden ten minste vijf dieren per dosisgroep gebruikt. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.

De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in referentie (1). De doses worden gekozen uit de concentratiereeks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet er rekening worden gehouden met bestaande gegevens over de acute toxiciteit en huidirritatie, wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en overmatige lokale huidirritatie leidt (2) (11).

Het medium wordt zodanig gekozen dat de testconcentraties en de oplosbaarheid maximaal zijn terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof op te brengen. In volgorde van voorkeur worden aanbevolen: aceton/olijfolie (4:1 v/v), dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (2) (10), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat er hydrofiele bestanddelen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt. Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.

1.3.3 Testprocedure

1.3.3.1 Proefopzet

De proefopzet van de bepaling is als volgt:

- *Dag 1:*
Van elk dier apart wordt het gewicht bepaald en vastgelegd. Vervolgens wordt 25 µl van de verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de positieve controle open aangebracht op het dorsum van elk oor.
- *Dagen 2 en 3:*
Herhaal de aanbrengprocedure van dag 1.
- *Dagen 4 en 5:*
Geen behandeling.
- *Dag 6:*
Van elk dier wordt het gewicht vastgelegd. Injecteer bij de muizen van alle test- en controlegroepen 250 µl PBS (phosphate-buffered saline) die 20 µCi (7,4e + 8 Bq) ³H-methylthymidine bevat, in de staartader. Een andere mogelijkheid is injectie van 250 µl PBS die 2 µCi (7,4e + 7 Bq) ¹²⁵I-jooddeoxyuridine en 10⁻⁵ M fluorodeoxyuridine bevat, bij alle muizen in de staartader.
Vijf uur later worden de dieren gedood. De afvoerende auriculaire lymfklieren van elk oor worden uitgerepareerd en voor elke groep gepoold in PBS (groepsgewijze aanpak); het is ook mogelijk voor elk dier apart de twee lymfklieren in PBS te poolen (individuele aanpak). Bijlage I van referentie 10 bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren.

1.3.3.2 Bereiding van de celsuspensies

Er wordt één celsuspensie gemaakt met lymfkliercellen van gepoolde groepen of van aparte dieren door het weefsel voorzichtig door een roestvrij stalen gaas met een maaswijdte van 200 µm te persen. De lymfkliercellen worden twee maal gewassen met een overmaat PBS en gedurende 18 uur met 5 % trichloorazijnzuur (TCA) neergeslagen bij 4 °C (1). Het neerslag wordt geresuspendeerd in 1 ml TCA en voor ³H-telling overgebracht in scintillatie-telflesjes die 10 ml scintillatievloei-stof bevatten, of direct overgebracht in gamma-telbuizen voor ¹²⁵I-telling.

1.3.3.3 Bepaling van celproliferatie (opgenomen radioactiviteit)

De opname van ³H-methylthymidine wordt gemeten door β-scintillatietelling als desintegraties per minuut (DPM). De opname van ¹²⁵I-jooddeoxyuridine wordt gemeten door ¹²⁵I-telling en ook als DPM uitgedrukt. Afhankelijk van de gevolgde werkwijze wordt de opname uitgedrukt als DPM/behandelingsgroep (groepsgewijze aanpak) of DPM/dier (individuele aanpak).

1.3.3.4 Observatie

1.3.3.4.1 Klinische observatie

De dieren worden één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale toxiciteit op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle observaties worden systematisch geregistreerd en van elk dier wordt een apart overzicht bijgehouden.

1.3.3.4.2 Lichaamsgewicht

Zoals onder punt 1.3.3.1 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

1.3.4 Berekening van de resultaten

De resultaten worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). Bij de groepsgewijze aanpak wordt de SI berekend door de totale opname van radioactiviteit voor elke behandelde groep te delen door de totale opname van radioactiviteit voor de medium-controlegroep; dit levert een gemiddelde SI op. Bij de individuele aanpak wordt de SI berekend door de gemiddelde DPM/dier van elke groep behandeld met teststof en de positieve controle groep, te delen door de gemiddelde DPM/dier voor de medium controle groep. De gemiddelde SI voor de met medium behandelde controles is dan 1.

Wanneer voor de berekening van de SI de individuele aanpak wordt gevolgd, kan er een statistische analyse van de gegevens worden uitgevoerd. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke verschillen in de variantie en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. Een geschikte aanpak voor de interpretatie van de gegevens is dat alle individuele gegevens van behandelde dieren en medium-controles worden geëvalueerd en dat daaruit, rekening houdend met de betrouwbaarheidsgrenzen, de best passende dosis/responscurve wordt afgeleid (8) (12) (13). De onderzoeker moet echter alert zijn op mogelijke "uitbijters" bij bepaalde dieren in een groep, waardoor het nodig kan zijn een andere maat voor de respons te gebruiken (bijvoorbeeld de mediaan in plaats van het gemiddelde) of de uitbijter te elimineren.

Wanneer er tot een positieve respons wordt besloten, moet de stimuleringsindex ≥ 3 zijn en moet er rekening worden gehouden met de dosis/responsverhouding en eventueel de statistische significantie (3) (6) (8) (12) (14).

Als de verkregen resultaten onduidelijk zijn, moet er worden gekeken naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt en wat de aard van de waargenomen respons is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (7).

2 GEGEVENS

De gegevens worden vermeld in een tabel met het gemiddelde en de afzonderlijke DPM-waarden en stimuleringsindices voor elke dosisgroep (en tevens de medium-controlegroep).

3 RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen :

Teststof :

- identificatiegegevens (b.v. het CAS-nr., indien beschikbaar, de herkomst, de zuiverheid, bekende verontreinigingen en het chargennummer);
- de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (b.v. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);
- bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte.

Medium :

- identificatiegegevens (de zuiverheid, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume);
- een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren :

- de gebruikte muizenstam;
- de microbiologische status van de dieren, wanneer dit bekend is;
- het aantal dieren, de leeftijd en het geslacht;
- de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden :

- gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;
- bewegredenen voor de keuze van de dosisniveaus, zoals de resultaten van een studie om het interval te bepalen indien deze is uitgevoerd, het gebruikte medium en de concentratie van de teststof en de in totaal aangebrachte hoeveelheid stof;
- gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water).

Betrouwbaarheidscontrole :

- een overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de stof, de concentratie en het gebruikte medium;
- tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en negatieve controlegegevens voor het testlaboratorium.

Resultaten :

- het gewicht van elk dier aan het begin van de test en wanneer het volgens schema wordt gedood;
- een tabel met het gemiddelde (groepsgewijze aanpak) en de afzonderlijke (individuele aanpak) DPM-waarden plus de spreiding van waarden voor beide mogelijkheden, en stimuleringsindices voor elke dosisgroep (en tevens de medium-controlegroep);
- de statistische analyse, indien van toepassing;
- voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan.

Bespreking van de resultaten :

- Een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

4 REFERENTIES

- 1 Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions : A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165-169.
- 2 Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay : developments and applications. *Toxicology*, 93, 13-31.
- 3 Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay : An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563-79.
- 4 Testmethode B.6.
- 5 Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay : status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999-1002.
- 6 Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985-997.
- 7 Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 327-33.
- 8 Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay : employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49-59.
- 9 Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281-4.
- 10 National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay : A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds : The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No : 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11 Testmethode B.4.
- 12 Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W, Lees, D, Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63-67.
- 13 Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261-266.
- 14 Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42,344-48.

B.43. NEUROTOXICITEITSONDERZOEK BIJ KNAAGDIEREN

1 METHODE

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 424 (1997) van de OESO.

Deze testmethode is bedoeld om de nodige informatie te krijgen om de mogelijke neurotoxiciteit van chemische stoffen bij volwassen dieren te bevestigen of nader te karakteriseren. Hij kan in combinatie met bestaande testmethoden voor onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening worden gebruikt of als zelfstandig onderzoek worden uitgevoerd. Raadpleging van de OESO-leidraad voor strategieën en methoden voor neurotoxiciteitsonderzoek (1) als ondersteuning bij de opzet van onderzoek op basis van deze testmethode wordt aanbevolen. Dit is vooral belangrijk wanneer wordt overwogen de voor het standaardgebruik van deze methode aanbevolen observaties en testprocedures te wijzigen. De leidraad is opgesteld om de keuze van andere testprocedures voor specifieke omstandigheden te vergemakkelijken.

Deze methode is niet geschikt voor de beoordeling van ontwikkelingsneurotoxiciteit.

1.1 INLEIDING

Bij de beoordeling en evaluatie van de toxische karakteristieken van chemische stoffen is het belangrijk de mogelijkheid van neurotoxische effecten te bezien. In de testmethode voor systemische toxiciteit bij herhaalde toediening zijn al observaties opgenomen om op mogelijke neurotoxiciteit te screenen. Deze testmethode kan worden gebruikt voor de opzet van een onderzoek om nadere informatie te verkrijgen over de neurotoxische effecten die bij het onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening zijn gesignaleerd of om deze effecten te bevestigen. Ook zonder dat onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening aanwijzingen voor een mogelijke neurotoxiciteit heeft opgeleverd, kunnen er voor sommige categorieën chemische stoffen echter aanwijzingen zijn dat ze beter met behulp van deze methode kunnen worden beoordeeld. Voorbeelden van dergelijke aanwijzingen zijn :

- waarneming van neurologische verschijnselen of neuropathologisch letsel bij ander toxiciteitsonderzoek dan onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening of
- een structurele verwantschap met stoffen waarvan bekend is dat ze neurotoxisch zijn of andere informatie die een verband met dergelijke stoffen legt.

Daarnaast kan het gebruik van deze testmethode ook in andere gevallen nuttig zijn; zie voor nadere bijzonderheden (1).

Deze methode is zodanig opgezet dat hij op maat kan worden aangepast aan bepaalde behoeften om de specifieke histopathologische en gedragsmatige neurotoxiciteit van een chemische stof te bevestigen en voor een karakterisering en kwantificering van de neurotoxische reacties te zorgen.

In het verleden werd neurotoxiciteit gelijkgesteld met neuropathie met neuropathologisch letsel of neurologische stoornissen zoals een epileptische aanval, verlamming of tremor. Hoewel neuropathie een belangrijke uiting van neurotoxiciteit is, is het nu duidelijk dat er vele andere verschijnselen van toxiciteit voor het zenuwstelsel zijn (b.v. het verlies van motorische coördinatie, sensorische afwijkingen en leer- en geheugenstoornissen) die bij een onderzoek naar neuropathie of ander onderzoek niet altijd naar voren komen.

Deze testmethode voor neurotoxiciteit is bedoeld om ernstige neuropathologische en neurogedragseffecten bij volwassen knaagdieren te detecteren. Gedragseffecten kunnen weliswaar ook zonder morfologische veranderingen nadelige gevolgen voor het organisme inhouden, maar niet alle gedragsveranderingen zijn specifiek voor het zenuwstelsel. Daarom moeten waargenomen veranderingen worden geëvalueerd in samenhang met gerelateerde histopathologische, hematologische of biochemische gegevens en gegevens over andere vormen van systemische toxiciteit. De in deze methode opgenomen tests met het oog op een karakterisering en kwantificering van de neurotoxische reacties omvatten specifieke histopathologische en gedragsprocedures die nader kunnen worden ondersteund met elektrofysiologisch en/of biochemisch onderzoek (1) (2) (3) (4).

Neurotoxica kunnen optreden via een aantal aangrijpingspunten binnen het zenuwstelsel en een scala van mechanismen. Aangezien er niet één pakket tests is waarmee de neurotoxische potentie van alle stoffen volledig kan worden beoordeeld, kan het nodig zijn andere *in vivo* of *in vitro* tests te gebruiken die specifiek zijn voor de waargenomen of verwachte soorten neurotoxiciteit.

Deze testmethode kan ook in combinatie met de richtsnoeren van de OESO-leidraad voor strategieën en methoden voor neurotoxiciteitsonderzoek (1) worden gebruikt om onderzoek op te zetten waarmee de dosis/responskwantificering nader kan worden gekarakteriseerd of de gevoeligheid kan worden verhoogd teneinde een betere bepaling van de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten mogelijk te maken of bekende of vermoede gevaren van de chemische stof te staven. Er kan bijvoorbeeld onderzoek worden opgezet om de neurotoxische mechanismen te bepalen en te evalueren of om de gegevens aan te vullen die al beschikbaar zijn door het gebruik van basisprocedures voor neuropathologische en neurogedragsobservatie. Als gegevens die door het gebruik van de in deze methode aanbevolen standaardprocedures worden verkregen, al beschikbaar zijn en niet nodig worden geacht voor de interpretatie van de resultaten van het onderzoek, behoeven ze niet met dit onderzoek opnieuw te worden vergaard.

Dit onderzoek naar neurotoxiciteit levert, zelfstandig of in combinatie gebruikt, informatie op die :

- kan aangeven of het zenuwstelsel door de geteste chemische stof permanent of reversibel wordt aangetast;
- kan bijdragen tot de karakterisering van de wijzigingen in het zenuwstelsel ten gevolge van de blootstelling aan de chemische stof en tot inzicht in het mechanisme daarvan;
- het verband tussen dosis en respons en tussen tijd en respons kan bepalen teneinde een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten te kunnen bepalen (die kan worden gebruikt om veiligheidscriteria voor de chemische stof vast te stellen).

Bij deze testmethode wordt de teststof oraal toegediend. Andere toedieningswegen (b.v. dermaal of inhalatie) kunnen geschikter zijn en hiervoor kan het nodig zijn de aanbevolen procedures te wijzigen. De keuze van de toedieningsweg wordt bepaald door het blootstellingsprofiel bij de mens en de beschikbare toxicologische of kinetische informatie.

1.2 DEFINITIES

Schadelijk effect : een met de behandeling samenhangende afwijking van de normale situatie waardoor het organisme minder goed in staat is tot overleven, reproductie of aanpassing aan de omgeving.

Dosis : de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht (g, mg), als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bijvoorbeeld mg/kg) of als constante concentratie in het voer (ppm).

Dosering : een algemene term die de dosis en de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Neurotoxiciteit : een schadelijke verandering in de structuur of de functie van het zenuwstelsel die een gevolg is van blootstelling aan een chemisch, biologisch of fysisch agens.

Neurotoxicum : een chemisch, biologisch of fysisch agens dat in staat is neurotoxiciteit te veroorzaken.

NOAEL : de afkorting van "no-observed-adverse effect level" (dosis zonder waargenomen schadelijke effecten), d.w.z. de hoogste dosis waarbij er geen met de behandeling samenhangende schadelijke gevolgen worden waargenomen.

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in een aantal doses oraal toegediend aan verschillende groepen knaagdieren. Meestal is herhaalde toediening nodig gedurende 28 dagen of in de vorm van subchronisch (90 dagen) of chronisch (een jaar of langer) onderzoek. De in deze testmethode beschreven procedures kunnen ook worden gebruikt voor een onderzoek naar acute neurotoxiciteit. De dieren worden getest om afwijkend gedrag en/of neurologische afwijkingen te kunnen detecteren of karakteriseren. Gedurende elke observatieperiode wordt een scala van gedragsuitingen beoordeeld dat door neurotoxica kan worden beïnvloed. Aan het eind van de test wordt een deel van de dieren van elk geslacht van elke groep *in situ* geperfundeed en worden er secties van de hersenen, het ruggenmerg en de perifere zenuwen geprepareerd en onderzocht.

Wanneer het onderzoek zelfstandig als screening voor neurotoxiciteit of voor de karakterisering van neurotoxische effecten wordt uitgevoerd, kunnen de dieren van elke groep die niet voor perfusie en vervolgens histopathologie worden gebruikt (zie tabel 1), voor specifieke neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische of neurogedragsprocedures worden gebruikt waarmee de gegevens kunnen worden aangevuld die worden verkregen uit het verplichte standaardonderzoek van deze methode (1). Deze aanvullende procedures kunnen bijzonder nuttig zijn wanneer empirische observaties of verwachte effecten wijzen op een specifiek type of aangrijpingspunt voor de neurotoxiciteit van een chemische stof. Anderzijds is het ook mogelijk de resterende dieren te gebruiken voor evaluaties zoals die zijn opgenomen in testmethoden voor onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening bij knaagdieren.

Wanneer de procedures van deze testmethode in combinatie met die van andere testmethoden worden gebruikt, is er een voldoende aantal dieren nodig om aan de observatievereisten voor beide onderzoeken te voldoen.

1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 Keuze van de diersoort

Bij voorkeur wordt de rat gebruikt, maar ook andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt wanneer hiervoor een motivering wordt gegeven. Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. De toediening begint zo spoedig mogelijk na het spenen, bij voorkeur uiterlijk wanneer de dieren zes weken oud zijn en in elk geval voordat de dieren negen weken oud zijn. Wanneer dit onderzoek met andere onderzoeken wordt gecombineerd, kan het echter

nodig zijn deze leeftijdseis aan te passen. Aan het begin van het onderzoek mag het lichaamsgewicht van de dieren niet meer dan $\pm 20\%$ afwijken van het gemiddelde gewicht voor elk geslacht. Wanneer een onderzoek met herhaalde toediening van korte duur als voorbereiding op een langdurig onderzoek wordt uitgevoerd, moeten bij beide onderzoeken dieren van dezelfde stam en dezelfde herkomst worden gebruikt.

1.4.2 Huisvesting en voeding

De temperatuur in de proefdierruimte dient $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30% en bij voorkeur niet hoger dan 70% (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar $50\text{--}60\%$. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Harde onregelmatige geluiden moeten tot een minimum worden beperkt. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof in het voer wordt toegediend. De dieren mogen apart of in kleine groepen met hetzelfde geslacht worden gehuisvest.

1.4.3 Voorbereiding van de dieren

De gezonde jonge dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelings- en controlegroepen. De kooien worden zodanig opgesteld dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooien tot een minimum worden beperkt. De dieren worden op unieke wijze gemerkt en vóór het begin van het onderzoek gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

1.4.4 Toedieningsweg en bereiding van de dosis

Deze testmethode behandelt specifiek de orale toediening van de teststof. De orale toediening kan met een maagsonde, in het voer, in het drinkwater of met capsules gebeuren. Ook andere toedieningswegen (b.v. dermaal of inhalatie) kunnen worden gebruikt, maar hiervoor moeten de aanbevolen procedures wellicht worden gewijzigd. De keuze van de toedieningsweg wordt bepaald door het bloedstellingsprofiel bij de mens en de beschikbare toxicologische of kinetische informatie. De motivering voor de keuze van de toedieningsweg en hieruit voortvloeiende wijzigingen in de procedures van deze testmethode moeten worden vermeld.

Waar nodig kan de teststof in een geschikt medium worden opgelost of gesuspenseerd. In eerste instantie wordt het gebruik van een waterige oplossing/suspensie aanbevolen, als tweede keuze een oplossing/suspensie in olie (bijvoorbeeld maïsolie) en uiteindelijk eventueel een oplossing/suspensie in een ander medium. De toxicologische kenmerken van het medium moeten bekend zijn. Daarnaast moet aandacht worden besteed aan de volgende kenmerken van het medium: effecten van het medium op de resorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof die wellicht gevolgen kunnen hebben voor de toxicologische kenmerken, en effecten op de consumptie van voer of water of de voedingsstatus van de dieren.

1.5 PROCEDURE

1.5.1 Aantal en geslacht van de dieren

Wanneer het onderzoek zelfstandig wordt uitgevoerd, moeten er in elke dosis- en controlegroep ten minste 20 dieren (10 vrouwtjes en 10 mannetjes) worden gebruikt voor de evaluatie van gedetailleerde klinische en functionele observaties. Van deze 10 vrouwtjes en 10 mannetjes moeten ten minste 5 vrouwtjes en 5 mannetjes aan het eind van het onderzoek *in situ* worden geperfundeed en voor gedetailleerde neurohistopathologie worden gebruikt. Wanneer in een bepaalde dosisgroep slechts bij een beperkt aantal dieren verschijnselen van neurotoxische effecten worden geobserveerd, moet worden overwogen onder andere deze dieren voor perfusie te selecteren. Wanneer het onderzoek in combinatie met een onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening wordt uitgevoerd, moeten er voldoende dieren worden gebruikt om aan de doelstellingen van beide onderzoeken te voldoen. Tabel 1 bevat een overzicht van de minimale aantallen dieren per groep voor verschillende onderzoekcombinaties. Als het de bedoeling is tussentijds dieren te doden of bij bepaalde groepen na de behandeling te observeren of de toxische effecten reversibel zijn, blijven bestaan of vertraagd optreden of wanneer aanvullende observaties worden overwogen, moet het aantal dieren worden opgevoerd om ervoor te zorgen dat er voldoende dieren beschikbaar zijn voor observatie en histopathologie.

1.5.2 Behandelings- en controlegroepen

In het algemeen moeten er ten minste drie dosisgroepen en één controlegroep worden gebruikt, maar als er op grond van de beoordeling van andere gegevens bij herhaalde toediening van 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag geen effecten worden verwacht, kan er een limiettest worden uitgevoerd. Als er geen geschikte gegevens beschikbaar zijn, kan er een verkennend onderzoek worden uitgevoerd om de te gebruiken doses te helpen bepalen. Afgezien van de toediening van de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de dosisgroepen. Als er bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, moet het hoogste gebruikte volume van het medium aan de controlegroep worden toegediend.

1.5.3 Betrouwbaarheidscontrole

Het laboratorium dat het onderzoek uitvoert, moet gegevens verstrekken waaruit blijkt dat het in staat is het onderzoek uit te voeren en wat de gevoeligheid van de gebruikte procedures is. Uit deze gegevens moet blijken dat het veranderingen in de verschillende voor observatie aanbevolen eindpunten, zoals autonome verschijnselen, sensorische reactiviteit, grijpkracht van de ledematen en motorische activiteit, kan detecteren en eventueel kwantificeren. Voor informatie over chemische stoffen die verschillende soorten neurotoxische reacties veroorzaken en als positieve controle kunnen worden gebruikt, wordt verwezen naar de referenties (2) tot en met (9). Als de procedures in grote lijnen gelijk blijven, kunnen gegevens uit het verleden worden gebruikt. Periodieke bijwerking van gegevens uit het verleden wordt aanbevolen. Wanneer de uitvoering van de test of de procedures door het laboratorium op een essentieel punt wordt gewijzigd, moet met nieuwe gegevens worden aangetoond dat de gevoeligheid van de procedures op peil blijft.

1.5.4 Keuze van de doses

Bij de keuze van de dosisniveaus wordt rekening gehouden met eerder waargenomen toxiciteit en kinetische gegevens die voor de teststof of verwante materialen beschikbaar zijn. De hoogste dosis wordt zodanig gekozen dat er neurotoxische effecten of duidelijke systemische toxische effecten optreden. Vervolgens wordt er een zodanige dalende reeks dosisniveaus gekozen dat er een verband tussen dosis en respons kan worden gelegd en er bij de laagste dosis geen schadelijke effecten worden waargenomen (NOAEL). In beginsel worden de dosisniveaus zodanig gekozen dat primaire toxische effecten op het zenuwstelsel kunnen worden onderscheiden van effecten die samenhangen met systemische toxiciteit. Twee of drie intervals is vaak optimaal en in plaats van een zeer groot interval tussen de doses (b.v. meer dan een factor 10) verdient toevoeging van een vierde testgroep vaak de voorkeur. Wanneer er een redelijke raming van de blootstelling van de mens is, moet hier ook rekening mee worden gehouden.

1.5.5 Limiettest

Als een onderzoek met één dosis van ten minste 1 000 g/kg lichaamsgewicht/dag volgens de beschreven procedures geen waarneembare neurotoxische effecten oplevert en als toxiciteit op grond van gegevens van qua structuur verwante verbindingen niet te verwachten valt, zal een volledig onderzoek met drie dosisniveaus wellicht niet nodig worden geacht. Op grond van de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hogere orale dosis bij de limiettest nodig worden geacht. Bij andere toedieningswegen, bijvoorbeeld dermaal of inhalatie, wordt het maximaal haalbare blootstellingsniveau vaak bepaald door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof. Bij de uitvoering van een oraal acuut onderzoek moet de dosis voor een limiettest ten minste 2 000 mg/kg zijn.

1.5.6 Toediening van de dosis

De teststof wordt dagelijks, zeven dagen per week, gedurende ten minste 28 dagen aan de dieren toegediend; voor een toedieningsschema van vijf dagen per week of een kortere blootstellingsperiode moet een motivering worden gegeven. Wanneer de teststof met een sonde wordt toegediend, moet dit in één keer met een maagsonde of een geschikte katheter gebeuren. Het maximale volume van een vloeistof dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van de proefdieren. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij waterige oplossingen kan echter het gebruik van maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden overwogen. Behalve bij irriterende of bijtende stoffen, die normaal gesproken bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume wordt toegediend.

Het is belangrijk dat er bij stoffen die via het voer of het drinkwater worden toegediend, voor wordt gezorgd dat de hoeveelheden teststof de normale voer- of waterbalans niet verstoren. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante concentratie in het voer (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Wanneer een stof met een sonde wordt toegediend, moet de dosis elke dag op een vergelijkbaar tijdstip worden toegediend en indien nodig worden aangepast om een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier te houden. Wanneer een onderzoek met herhaalde toediening als voorbereiding op een langdurig onderzoek wordt gebruikt, moet bij beide onderzoeken een vergelijkbare voeding worden gebruikt. Bij acuut onderzoek kan de dosis, als toediening in één keer niet mogelijk is, in kleinere porties worden verdeeld die in de loop van maximaal 24 uur worden toegediend.

1.6 OBSERVATIE

1.6.1 Frequentie van de observaties en tests

Bij onderzoek met herhaalde toediening bestrijkt de observatieperiode de toedieningsperiode. Bij acuut onderzoek vindt de observatie gedurende 14 dagen na de toediening plaats. Bij dieren in satellietgroepen die gedurende een periode na de behandeling zonder blootstelling worden gehouden, moeten de observaties ook deze periode bestrijken.

De frequentie van de observaties moet voldoende zijn voor een maximale kans op detectie van eventuele neurologische en/of gedragsafwijkingen. De observatie moet bij voorkeur elke dag op hetzelfde tijdstip plaatsvinden en hierbij moet rekening worden gehouden met de piekperiode voor de verwachte effecten na de toediening. Tabel 2 bevat een overzicht van de frequentie van de klinische observaties en functionele tests. Als kinetische of andere gegevens uit eerder onderzoek erop wijzen dat verschillende tijdstippen voor observaties, tests of periodes na observaties nodig zijn, moet er een ander schema worden opgesteld om zo veel mogelijk informatie te verkrijgen. Voor veranderingen in het schema moet een motivering worden gegeven.

1.6.1.1 *Observatie van de algemene gezondheidstoestand en de mortaliteit/morbiditeit*

Alle dieren worden ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd om hun gezondheidstoestand te beoordelen en ten minste twee keer per dag op morbiditeit en mortaliteit.

1.6.1.2 *Gedetailleerde klinische observatie*

Bij alle hiervoor geselecteerde dieren (zie tabel 1) wordt één keer vóór de eerste blootstelling (om vergelijking per dier mogelijk te maken) en daarna met verschillende tussenpozen afhankelijk van de duur van het onderzoek (zie tabel 2) een gedetailleerde klinische observatie uitgevoerd. Bij satelliet-herstelgroepen dienen aan het eind van de herstelperiode gedetailleerde klinische observaties te worden uitgevoerd. Gedetailleerde klinische observaties dienen buiten het eigen hok in een standaard-loopruimte te gebeuren. Ze moeten zorgvuldig worden geregistreerd met behulp van scoresystemen met criteria of schalen voor elke meting bij de observatie. De gebruikte criteria of schalen moeten expliciet door het laboratorium worden gedefinieerd. Er moet worden getracht ervoor te zorgen dat de variaties in de testomstandigheden minimaal zijn (niet systematisch gerelateerd aan de behandeling) en dat de observaties worden uitgevoerd door geschoolde waarnemers die niet op de hoogte zijn van de gegeven behandeling.

Het verdient aanbeveling de observaties gestructureerd uit te voeren, waarbij voor elk dier op elk observatietijdstip systematisch goed gedefinieerde criteria worden gehanteerd (met inbegrip van een definitie van het "normale bereik"). Het "normale bereik" moet afdoende worden gedocumenteerd. Alle waargenomen verschijnselen moeten worden geregistreerd. Waar mogelijk moet ook de omvang van de waargenomen verschijnselen worden geregistreerd. Klinische observatie moet ten minste maar niet uitsluitend omvatten: veranderingen in huid, vacht, ogen en slijmvliezen, secretie en excretie van stoffen en autonome activiteit (b.v. tranen, pilo-erectie, verandering in pupilgrootte, een ongebruikelijk ademhalingspatroon en/of ademen door de mond, ongebruikelijke urineer- of ontlastingsverschijnselen en verkleuring van de urine).

Ook ongebruikelijke reacties ten aanzien van de lichaamshouding, de mate van activiteit (b.v. meer of minder exploratie van de standaard-loopruimte) en de coördinatie van de bewegingen dienen te worden geregistreerd. Verandering in gang (b.v. waggelen of ataxie), houding (b.v. gebocheld) en reactiviteit op vastpakken, neerzetten of andere omgevingsprikkels, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, convulsies of tremors, stereotiep gedrag (b.v. overmatige lichaamsverzorging, ongebruikelijke hoofdbewegingen, herhaaldelijk rondraaien) of bizar gedrag (b.v. bijten of overmatig likken, zelfverminking, achteruitlopen, stemgeluiden) of agressie moeten worden geregistreerd.

1.6.1.3 Functionele tests

Net als bij de gedetailleerde klinische observatie moeten ook de functionele tests bij alle hiervoor geselecteerde dieren (zie tabel 1) één keer vóór de eerste blootstelling en daarna geregeld worden uitgevoerd. Ook de frequentie van de functionele tests is afhankelijk van de duur van het onderzoek (zie tabel 2). Afgezien van de in tabel 2 vermelde observatieperiodes moeten ook zo kort mogelijk voordat de dieren worden gedood, functionele observaties bij satelliet-herstelgroepen worden uitgevoerd. Bij de functionele tests moet worden gekeken naar de sensorische reactiviteit op verschillende soorten prikkels [b.v. auditieve, visuele en proprioceptieve prikkels (5) (6) (7)], een beoordeling van de grijpkracht van ledematen (8) en een beoordeling van de motorische activiteit (9). De motorische activiteit moet worden gemeten met een geautomatiseerd apparaat dat zowel een afname als een toename van de activiteit kan detecteren. Als er een ander gedefinieerd systeem wordt gebruikt, moet dit kwantitatief zijn en moeten de gevoeligheid en de betrouwbaarheid worden aangetoond. Elk apparaat moet worden getest om de betrouwbaarheid in de loop der tijd en de consistentie van apparaat tot apparaat te waarborgen. Voor een gedetailleerdere beschrijving van de te volgen procedures wordt verwezen naar de respectieve referenties. Als er geen gegevens zijn (b.v. structuur/activiteit-relaties, epidemiologische gegevens of ander toxicologisch onderzoek) die aanwijzingen geven omtrent de mogelijke neurotoxische effecten, moet worden overwogen gespecialiseerdere tests op de sensorische en motorische functie of leren en geheugen uit te voeren om deze mogelijke effecten meer in detail te onderzoeken. Voor meer informatie over gespecialiseerdere tests en het gebruik daarvan wordt verwezen naar (1).

Bij wijze van uitzondering kunnen dieren die zodanige toxiciteitsverschijnselen vertonen dat deze de functionele test significant zouden storen, van deze test worden uitgesloten. Voor het uitsluiten van dieren van een functionele test moet een motivering worden gegeven.

1.6.2 Lichaamsgewicht en consumptie van voer en water

Bij onderzoek met een duur tot 90 dagen moeten alle dieren ten minste één keer per week worden gewogen en moet de voerconsumptie (de waterconsumptie als de teststof in het water wordt toegediend) ten minste wekelijks worden gemeten. Bij langdurig onderzoek moeten alle dieren de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gewogen en daarna ten minste één keer per vier weken. De eerste 13 weken wordt de voerconsumptie (de waterconsumptie als de teststof in het water wordt toegediend) ten minste wekelijks gemeten en daarna ongeveer één keer per drie maanden, tenzij met het oog op de gezondheidstoestand of de veranderingen in het lichaamsgewicht een ander ritme nodig is.

1.6.3 Oogheelkundig onderzoek

Bij een onderzoek dat langer dan 28 dagen duurt, moet vóór de toediening van de teststof en aan het einde van het onderzoek bij voorkeur bij alle dieren maar ten minste bij de dieren in de hoge dosis- en controlegroepen een oogheelkundig onderzoek worden uitgevoerd met een oftalmoscoop of een gelijkwaardig geschikt instrument. Als er veranderingen in de ogen worden waargenomen of als dit met het oog op klinische verschijnselen nodig is, moeten alle dieren worden onderzocht. Bij een langdurig onderzoek moet er ook na 13 weken een oogheelkundig onderzoek worden uitgevoerd. Het oogheelkundig onderzoek hoeft niet te worden uitgevoerd als deze gegevens al beschikbaar zijn uit ander onderzoek met een vergelijkbare duur en vergelijkbare dosisniveaus.

1.6.4 Hematologisch en klinisch-biochemisch onderzoek

Wanneer het onderzoek naar neurotoxiciteit in combinatie met een onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening wordt uitgevoerd, moeten er hematologisch onderzoek en klinisch-biochemische bepalingen worden uitgevoerd zoals dit in de desbetreffende methode voor het onderzoek naar systemische toxiciteit is beschreven. De monsterneming moet zodanig gebeuren dat mogelijke neurogedragseffecten tot een minimum worden beperkt.

1.6.5 Histopathologie

Het neuropathologisch onderzoek moet worden opgezet als aanvulling op en uitbreiding van de observaties tijdens de *in vivo* fase van het onderzoek. Weefsels van ten minste 5 dieren/geslacht/groep (zie tabel 1 en volgende paragraaf) worden *in situ* gefixeerd met behulp van algemeen erkende perfusie- en fixatietechnieken (zie referentie 3, hoofdstuk 5, en referentie 4, hoofdstuk 50). Waarneembare macroscopische veranderingen worden geregistreerd. Wanneer het onderzoek zelfstandig als screening voor neurotoxiciteit of voor de karakterisering van neurotoxische effecten wordt uitgevoerd, kunnen de overige dieren worden gebruikt voor specifieke neurogedragsprocedures (10) (11), neuropathologische procedures (10) (11) (12) (13), neurochemische procedures (10) (11) (14) (15) of elektrofysiologische procedures (10) (11) (16) (17) waarmee de hier beschreven procedures en onderzoeken kunnen worden aangevuld, of om meer dieren beschikbaar te hebben voor histopathologisch onderzoek. Deze aanvullende procedures zijn vooral nuttig wanneer empirische observaties of verwachte effecten wijzen op een specifiek type of aangrijpingspunt van de neurotoxiciteit (2) (3). Anderzijds is het ook mogelijk de resterende dieren te gebruiken voor standaard-pathologisch onderzoek zoals dat in de testmethode voor onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening wordt beschreven.

Bij elk weefselmonster in paraffine wordt een algemene kleurprocedure uitgevoerd, zoals hematoxyline en eosine (H&E), en wordt een microscopisch onderzoek uitgevoerd. Als er verschijnselen van perifere neuropathie worden waargenomen of vermoed, worden er monsters van perifere zenuwweefsel in kunststof onderzocht. Klinische verschijnselen kunnen ook aanwijzingen opleveren voor andere onderzoekplaatsen of het gebruik van speciale kleurprocedures. Richtsoenen voor andere plaatsen die kunnen worden onderzocht, zijn te vinden in (3) (4). Ook geschikte speciale kleurstoffen om specifieke soorten pathologische veranderingen aan te tonen, kunnen nuttig zijn (18).

Representatieve secties van het centrale en perifere zenuwstelsel worden histologisch onderzocht (zie referentie 3, hoofdstuk 5, en referentie 4, hoofdstuk 50). Normaal gesproken moeten onder andere de volgende gebieden worden onderzocht: de voorhersenen, het centrum van het cerebrum met een sectie door de hippocampus, de middenhersenen, het cerebellum, de pons, de medulla oblongata, het oog met oogzenuw en netvlies, het ruggenmerg bij de cervicale en lumbale verdikkingen, de ganglia van de dorsale wortel, de vezels van de dorsale en ventrale wortel, de proximale nervus ischiadicus, de proximale nervus tibialis (bij de knie) en de kuitspiervertakkingen van de nervus tibialis. Van het ruggenmerg en de perifere zenuwen moeten zowel dwarse of transversale als longitudinale secties worden gemaakt. Er moet worden gelet op het vaatstelsel van het zenuwstelsel. Tevens moet er een monster van een skeletspier, met name de kuitspier, worden onderzocht. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan plaatsen met een cellulaire en vezelstructuur en -patroon in het CZS en het PZS waarvan bekend is dat ze bijzonder gevoelig zijn voor neurotoxiciteit.

Voor een leidraad voor neuropathologische veranderingen die vaak een gevolg zijn van blootstelling aan een toxische stof, wordt verwezen naar de referenties (3) en (4). Een stapsgewijs onderzoek van de weefselmonsters wordt aanbevolen, waarbij secties van de hoogste dosisgroep eerst worden vergeleken met die van de controlegroep. Als er

in de monsters van deze groepen geen neuropathologische veranderingen worden waargenomen, is een verdere analyse niet nodig. Als er in de hoogste dosisgroep neuropathologische veranderingen worden waargenomen, worden er van elk van de mogelijk aangetaste weefsels van de tussengroepen en de laagste groep monsters genomen en sequentieel onderzocht.

Als er bij het kwalitatieve onderzoek bewijzen van neuropathologische veranderingen worden gevonden, moet er een tweede onderzoek worden uitgevoerd bij alle gebieden van het zenuwstelsel die deze veranderingen vertonen. Bij alle dosisgroepen worden er van elk van de mogelijkerwijs aangetaste gebieden secties gecodeerd en aselekt zonder de code te kennen onderzocht. De frequentie en de ernst van elk letsel worden geregistreerd. Nadat van alle gebieden van alle dosisgroepen de score is bepaald, kan de code worden verbroken en kan er een statistische analyse worden uitgevoerd om het verband tussen dosis en respons te bepalen. Van elk letsel moeten er voorbeelden van uiteenlopende ernst worden beschreven.

De neuropathologische bevindingen moeten in de context van de gedragsobservaties en metingen alsmede andere gegevens uit eerder en tegelijkertijd uitgevoerd onderzoek naar de systemische toxiciteit van de teststof worden geëvalueerd.

2 GEGEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast worden alle gegevens in tabelvorm samengevat met voor alle test- en controlegroepen vermelding van het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens het onderzoek dood is aangetroffen of op humane wijze is gedood met het tijdstip waarop ze zijn gestorven of gedood, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoonde, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van de aanvang, de duur, de aard en de ernst van eventuele toxische effecten, en het aantal dieren met letsel, met vermelding van de aard en de ernst van het letsel of de letsels.

2.2 EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek moeten worden geëvalueerd, waarbij wordt gekeken naar de incidentie, de ernst en de correlatie van neurogedragseffecten en neuropathologische effecten (en ook neurochemische en elektrofysiologische effecten als dit aanvullende onderzoek is uitgevoerd) en andere waargenomen schadelijke effecten. Waar mogelijk moeten getalsmatige resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden moeten gedurende de opzet van het onderzoek worden gekozen.

3 RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Teststof :

- de fysische aard (met inbegrip van isomerie, de zuiverheid en de fysisch-chemische eigenschappen);
- identificatiegegevens.

Medium (indien van toepassing) :

- een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren :

- de gebruikte soort/stam;
- het aantal dieren, hun leeftijd en hun geslacht;
- de herkomst, de huisvesting, de acclimatisering, de voeding enz;
- het gewicht van elk dier aan het begin van het onderzoek.

Testomstandigheden :

- gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereiding van het voer en de concentratie, de stabiliteit en de homogeniteit van het preparaat;
- een specificatie van de toegediende doses met gedetailleerde gegevens over het medium, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;
- een motivering voor de gekozen dosisniveaus;
- een motivering voor de blootstellingsroute en -duur;
- een omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gedetailleerde gegevens over het voer en het water.

Observatie en testprocedures :

- gedetailleerde gegevens over de keuze van dieren uit elke groep voor de perfusie-subgroepen;
- gedetailleerde gegevens over de scoresystemen met vermelding van de criteria en schaalindeling voor elke meting bij de gedetailleerde klinische observaties;
- gedetailleerde gegevens over de functionele tests voor de sensorische reactiviteit op verschillende soorten prikkels (b.v. auditieve, visuele en proprioceptieve prikkels), voor de beoordeling van de grijpkracht van ledematen, voor de beoordeling van de motorische activiteit (met een beschrijving van geautomatiseerde apparaten voor de detectie van de activiteit) en andere gebruikte procedures;
- gedetailleerde gegevens over het oogheelkundig onderzoek en eventueel het hematologisch onderzoek en de klinisch-biochemische tests met de desbetreffende referentiewaarden;
- gedetailleerde gegevens over specifieke neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische of neurogedragsprocedures.

Resultaten :

- het lichaamsgewicht/veranderingen in het lichaamsgewicht en het lichaamsgewicht bij de dood van het dier;
- de consumptie van voer en de consumptie van water, indien van toepassing;
- gegevens over de toxische respons per geslacht en dosisgroep, met vermelding van toxiciteitsverschijnselen of mortaliteit;

- de aard, de ernst en de duur (aanvangstijdstip en verloop) van de gedetailleerde klinische observaties (al dan niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van alle resultaten van de functionele tests;
- de obductiebevindingen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle resultaten van neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische of neurogedragsprocedures, indien beschikbaar;
- gegevens over de resorptie en het metabolisme, indien beschikbaar;
- een statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten :

- informatie over de dosis/respons-relatie;
- het verband tussen eventuele andere toxische effecten en een conclusie over het neurotoxisch vermogen van de teststof;
- de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten.

Conclusies :

- een specifieke vermelding van de algehele neurotoxiciteit van de teststof is wenselijk.

4 REFERENTIES

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60 : Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/ London.
5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery : Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments : Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.
11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.
12. Broxup, B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689-695.
13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343-352.
14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, 445-452.
15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368-378.
16. Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In : Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.
17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In : Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.
18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tabel I

Minimaal aantal dieren dat per groep nodig is wanneer het neurotoxiciteitsonderzoek zelfstandig of in combinatie met een ander onderzoek wordt uitgevoerd

	NEUROTOXICITEITSONDERZOEK UITGEVOERD:			
	Als zelfstandig onderzoek	In combinatie met het 28-dagen-onderzoek	In combinatie met het 90-dagen-onderzoek	In combinatie met het chronische toxiciteitsonderzoek
Totaal aantal dieren per groep	10 mannetjes en 10 vrouwtjes	10 mannetjes en 10 vrouwtjes	15 mannetjes en 15 vrouwtjes	25 mannetjes en 25 vrouwtjes
Gekozen aantal dieren voor functionele tests met gedetailleerde klinische observaties	10 mannetjes en 10 vrouwtjes	10 mannetjes en 10 vrouwtjes	10 mannetjes en 10 vrouwtjes	10 mannetjes en 10 vrouwtjes
Gekozen aantal dieren voor perfusie <i>in situ</i> en neurohistopathologie	5 mannetjes en 5 vrouwtjes	5 mannetjes en 5 vrouwtjes	5 mannetjes en 5 vrouwtjes	5 mannetjes en 5 vrouwtjes
Gekozen aantal dieren voor observaties herhaalde toediening en subchronische/chronische toxiciteit, hematologie, klinische biochemie, histopathologie enz., zoals vermeld in de respectieve <i>Richtsoeren</i>		5 mannetjes en 5 vrouwtjes	10 mannetjes [†] en 10 vrouwtjes	20 mannetjes [†] en 20 vrouwtjes
Aanvullende observaties, indien van toepassing	5 mannetjes en 5 vrouwtjes			

[†] Inclusief vijf dieren die als onderdeel van het neurotoxiciteitsonderzoek voor functionele tests en gedetailleerde klinische observaties zijn gekozen.

Tabel 2

Frequentie van de klinische observatie en functionele tests

Aard van de observaties		Duur van het onderzoek			
		Acuut	28 dagen	90 dagen	Chronisch
Bij alle dieren	Algemene gezondheidstoestand	dagelijks	dagelijks	dagelijks	dagelijks
	Mortaliteit/morbiditeit	Twee keer per dag	Twee keer per dag	Twee keer per dag	Twee keer per dag
Bij dieren die voor de functionele observaties gekozen zijn	Gedetailleerde klinische observaties	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - binnen 8 uur na toediening op geraamde tijdstip piekeffect - op dagen 7 en 14 na toediening 	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - vervolgens één keer per week 	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - één keer tijdens de eerste of tweede week van blootstelling - vervolgens één keer per maand 	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - één keer aan het eind van de eerste maand van blootstelling - vervolgens één keer per drie maanden
	Functionele tests	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - binnen 8 uur na toediening op geraamde tijdstip piekeffect - op dagen 7 en 14 na toediening 	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - tijdens de vierde week van behandeling, zo dicht mogelijk bij het eind van de blootstellingsperiode 	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - één keer tijdens de eerste of tweede week van blootstelling - vervolgens één keer per maand 	<ul style="list-style-type: none"> - vóór eerste blootstelling - één keer aan het eind van de eerste maand van blootstelling - vervolgens één keer per drie maanden

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBACK

>

Bijlage 11**« C.21 : MICRO-ORGANISMEN IN DE BODEM : BEPALING VAN DE OMZETTING VAN STIKSTOF****1 METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 216 (2000) van de OESO.

1.1 INLEIDING

In deze testmethode wordt een laboratoriumtest beschreven om te onderzoeken welke effecten chemische stoffen na één blootstelling op lange termijn hebben op de omzetting van stikstof door micro-organismen in de bodem. De test is in eerste instantie gebaseerd op aanbevelingen van de Organisatie voor de bescherming van planten in Europa en het Middellandse-Zeegebied (1). Er is echter ook rekening gehouden met andere richtsnoeren, bijvoorbeeld van de Biologische Bundesanstalt in Duitsland (2), het Environmental Protection Agency in de VS (3) de SETAC (4) en de Internationale Organisatie voor Normalisatie (5). Tijdens een workshop van de OESO over de selectie van bodem/sediment in Belgirate in Italië in 1995 (6) is overeenstemming bereikt over het aantal en de aard van de in deze test te gebruiken bodemmonsters. De aanbevelingen voor het verzamelen, behandelen en bewaren van de bodemmonsters zijn gebaseerd op ISO-richtsnoeren (7) en aanbevelingen van de workshop in Belgirate. Bij de beoordeling en evaluatie van toxische kenmerken van teststoffen kan het nodig zijn de effecten op de microbiële activiteit van de bodem te bepalen, bijvoorbeeld wanneer er gegevens over de potentiële neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen op de microflora van de bodem nodig zijn of wanneer wordt verwacht dat de micro-organismen in de bodem aan andere chemische stoffen dan gewasbeschermingsmiddelen worden blootgesteld. De bepaling van de omzetting van stikstof wordt uitgevoerd om de effecten van deze chemische stoffen op de microflora van de bodem te bepalen. Als er landbouwchemicaliën (b.v. gewasbeschermingsmiddelen, kunstmest of bosbouwchemicaliën) worden getest, worden zowel de bepaling van de omzetting van stikstof als de bepaling van de omzetting van koolstof uitgevoerd. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, volstaat de bepaling van de omzetting van stikstof. Als de EC_{50} bij de bepaling van de omzetting van stikstof voor dergelijke stoffen echter binnen het bereik valt van de waarde die voor in de handel verkrijgbare nitrificatieremmers (zoals nitrapyrin) wordt gevonden, kan een bepaling van de omzetting van koolstof worden uitgevoerd om nadere informatie te verkrijgen.

De bodem bestaat uit levende en niet-levende componenten die complexe en heterogene mengsels kunnen vormen. Micro-organismen spelen een belangrijke rol bij de afbraak en omzetting van organisch materiaal in vruchtbare bodem en veel soorten dragen bij tot verschillende aspecten van de vruchtbaarheid van de bodem. Een verstoring van deze biochemische processen op lange termijn kan mogelijk de cycli van nutriënten verstoren en verandering brengen in de vruchtbaarheid van de bodem. Omzetting van koolstof en stikstof vindt in elke vruchtbare bodem plaats. Hoewel de voor deze processen verantwoordelijke microbiële levensgemeenschappen van bodem tot bodem verschillen, zijn de omzettingroutes in grote lijnen gelijk.

De hier beschreven testmethode is bedoeld om te detecteren welke schadelijke effecten een stof op lange termijn op het omzettingsproces van stikstof in aërobe bodem aan het oppervlak kan hebben. Met de testmethode kunnen ook de effecten van stoffen op de omzetting van koolstof door de microflora in de bodem worden bepaald. De vorming van nitraat vindt plaats na het verbreken van de koolstof/stikstof-binding. Als er in de behandelde en de controlebodem een even hoge nitraatproductie wordt gemeten, is het daarom zeer waarschijnlijk dat de belangrijkste afbraakroutes voor koolstof intact zijn en functioneren. Het voor de test gekozen substraat (verpoederd luzernemeel) heeft een gunstige koolstof/stikstof-verhouding (meestal tussen 12/1 en 16/1). Daardoor is er tijdens de test een geringer koolstoftekort en kunnen microbiële levensgemeenschappen, als ze door een chemische stof worden aangetast, zich binnen 100 dagen weer herstellen.

Deze testmethode is ontwikkeld uit tests die in eerste instantie bedoeld waren voor stoffen waarvoor kan worden geraamd welke hoeveelheid de bodem bereikt. Dit geldt bijvoorbeeld voor gewasbeschermingsmiddelen die in bekende hoeveelheden op het veld worden gebracht. Voor landbouwchemicaliën is het voldoende twee doses te testen die relevant zijn voor de opgebrachte hoeveelheid die wordt verwacht of geraamd. Landbouwchemicaliën kunnen als werkzame stof of als geformuleerd product worden getest. De test kan echter ook voor andere stoffen worden gebruikt. Door zowel de op de bodem gebrachte hoeveelheid teststof als de manier waarop de gegevens worden geëvalueerd, te veranderen, kan de test ook worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor niet bekend is hoeveel er naar verwachting in de bodem terecht zal komen. Daarom worden voor andere stoffen dan landbouwchemicaliën de effecten van een reeks concentraties op de omzetting van stikstof bepaald. De gegevens uit deze tests worden gebruikt om een dosis/respons-curve samen te stellen en EC_x -waarden te berekenen, waarbij x het procentuele effect aangeeft.

1.2 DEFINITIES

Omzetting van stikstof : de uiteindelijke afbraak van stikstofhoudend organisch materiaal door micro-organismen via ammonificatie en nitrificatie tot het anorganische eindproduct nitraat.

EC_x (effectieve concentratie) : de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van stikstof in nitraat met x procent.

EC_{50} (mediaan van de effectieve concentratie) : de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van stikstof in nitraat met 50 procent (50 %).

1.3 REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Gezeefde bodem wordt verbeterd met verpoederd plantenmeel en hetzij behandeld met de teststof, hetzij niet behandeld (controle). Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt aanbevolen minimaal twee concentraties te testen die moeten worden gekozen op grond van de hoogste concentratie die op het veld wordt verwacht. Na 0, 7, 14 en 28 dagen incubatie worden monsters van de behandelde en de controlebodem geëxtraheerd met een geschikt oplosmiddel en wordt de hoeveelheid nitraat in de extracten bepaald. De nitraatvorming in de behandelde monsters wordt vergeleken met de controlemonsters en de procentuele afwijking van de behandelde ten opzichte van de controlemonsters wordt berekend. Alle tests duren ten minste 28 dagen. Als op dag 28 het verschil tussen de behandelde en de controlebodem 25 % of groter is, worden de metingen voortgezet tot maximaal 100 dagen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de teststof in een reeks concentraties aan de bodemmonsters toegevoegd en wordt na 28 dagen incubatie de hoeveelheid nitraat in de behandelde en de controlemonsters bepaald. De resultaten van tests met verschillende concentraties worden aan regressieanalyse onderworpen en de EC_x -waarden (d.w.z. de EC_{50} , de EC_{25} en/of de EC_{10}) worden berekend. Zie ook de definities.

1.5 GELDIGHED VAN DE TEST

Bij landbouwchemicaliën wordt de evaluatie van de testresultaten gebaseerd op betrekkelijk kleine verschillen (gemiddeld $\pm 25\%$) tussen de nitraatconcentratie in de behandelde en de controlemonsters en grote verschillen in de controles kunnen dan ook tot onjuiste resultaten leiden. Het verschil tussen replicaat-controlemonsters moet derhalve kleiner zijn dan $\pm 15\%$.

1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1 Apparatuur

Er worden testbakken van chemisch inert materiaal gebruikt. Het volume moet geschikt zijn voor de procedure die voor de incubatie van de bodem wordt gebruikt, d.w.z. incubatie in één keer of als een reeks afzonderlijke bodemmonsters (zie punt 1.7.1.2). Het waterverlies moet tot een minimum worden beperkt maar gasuitwisseling moet tijdens de test mogelijk zijn (de testbakken kunnen bijvoorbeeld met geperforeerde polyetheenfolie worden afgedekt). Wanneer vluchtige stoffen worden getest, moeten er afsluitbare gasdichte bakken worden gebruikt. Deze moeten zo groot zijn dat het bodemmonster ongeveer een kwart van hun volume beslaat.

Er wordt standaard-laboratoriumapparatuur gebruikt, waaronder :

- een schudapparaat : een mechanische schudmachine of gelijkwaardige apparatuur;
- een centrifuge (3 000 g) of filtreerapparaat (met nitraatvrij filtreerpapier);
- een instrument voor nitraatanalyse met een afdoende gevoeligheid en reproduceerbaarheid.

1.6.2 Selectie en aantal bodemsoorten

Er wordt één bodemsoort gebruikt. De aanbevolen kenmerken van de bodem zijn :

- zandgehalte : minimaal 50 % en maximaal 75 %;
- pH : 5,5 – 7,5;
- organisch koolstofgehalte : 0,5 – 1,5 %;
- de microbiële biomassa moet worden gemeten (8) (9) en het koolstofgehalte daarvan moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn.

In de meeste gevallen levert een bodem met deze kenmerken de ongunstigste situatie op, aangezien de adsorptie van de teststof minimaal is en de beschikbaarheid voor de flora maximaal. Een test met andere bodemsoorten is dan ook meestal niet nodig. In bepaalde gevallen, bijvoorbeeld wanneer de teststof naar verwachting vooral bij bepaalde bodemsoorten zoals zure bosgrond zal worden gebruikt of bij elektrostatisch geladen chemische stoffen, kan het echter nodig zijn nog een andere bodemsoort te gebruiken.

1.6.3 Verzameling en opslag van de bodemmonsters

1.6.3.1 Verzameling

Er moet gedetailleerde informatie beschikbaar zijn over de geschiedenis van de locatie waar de testbodem wordt verzameld, zoals de exacte ligging, de vegetatie, de data van behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met organische en anorganische mest, toevoegingen van biologisch materiaal en onopzettelijke verontreinigingen. De voor de verzameling van de bodem gekozen locatie moet op lange termijn kunnen worden gebruikt. Permanente weidegrond en velden met eenjarige graangewassen (behalve maïs) of dicht ingezaaide groenbemestingsgewassen zijn geschikt. De gekozen monsternemingsplaats mag gedurende ten minste één jaar vóór de monsterneming niet met gewasbeschermingsmiddelen zijn behandeld. Ook mag er gedurende ten minste zes maanden geen organische mest zijn opgebracht. Het gebruik van anorganische mest is alleen aanvaardbaar wanneer dit in overeenstemming met de eisen van het gewas is en er mogen gedurende ten minste drie maanden na de opbrenging van de mest geen monsters worden genomen. Het gebruik van grond die is behandeld met meststoffen waarvan bekend is dat ze biocide-effecten hebben (b.v. calciumcyanamide) moet worden vermeden.

Gedurende of vlak na lange perioden (meer dan 30 dagen) van droogte of doordrenking van de bodem mogen er geen monsters worden genomen. Bij een omgeploegde bodem moeten de monsters van een diepte van 0 tot 20 cm worden genomen. Bij grasland (weidegrond) of andere bodemsoorten waar gedurende lange perioden (ten minste één teeltseizoen) niet geploegd wordt, kan de maximale monsterdiepte iets groter dan 20 cm (b.v. maximaal 25 cm) zijn.

De bakken waarin en de temperatuur waarbij de bodemmonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat de oorspronkelijke eigenschappen van de bodem niet significant veranderen.

1.6.3.2 Opslag

Het gebruik van grond die net van het veld komt, verdient de voorkeur. Als opslag in het laboratorium niet kan worden vermeden, kan de grond gedurende maximaal drie maanden in het donker bij $4 \pm 2\text{ °C}$ worden bewaard. Tijdens de opslag van grond moet er voor aërobe omstandigheden worden gezorgd. Als de grond wordt verzameld in gebieden waar deze gedurende ten minste drie maanden per jaar bevriest, is opslag gedurende zes maanden bij -18 °C tot -22 °C mogelijk. Vóór elk experiment wordt de microbiële biomassa van opgeslagen grond gemeten; het koolstofgehalte van de biomassa moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn (zie punt 1.6.2).

1.6.4 Behandeling en voorbereiding van de grond voor de test

1.6.4.1 Pre-incubatie

Als de grond opgeslagen was (zie punt 1.6.3.2), wordt pre-incubatie gedurende 2 tot 28 dagen aanbevolen. De temperatuur en het vochtgehalte van de bodem tijdens de pre-incubatie moeten vergelijkbaar zijn met die tijdens de test (zie de punten 1.6.4.2 en 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fysisch-chemische kenmerken*

De grond wordt met de hand ontdaan van grote voorwerpen (stenen, delen van planten enz.) en zonder overmatig drogen vochtig gezeefd tot een deeltjesgrootte van maximaal 2 mm. Het vochtgehalte van het bodemmonster moet met gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden aangepast tot 40-60 % van het maximale watergehalte.

1.6.4.3 *Verbetering met organisch substraat*

De bodem wordt verbeterd met een geschikt organisch substraat, zoals verpoederd luzerne/grasmeel (hoofdbestanddeel *Medicago sativa*) met een C/N-verhouding tussen 12/1 en 16/1. De aanbevolen luzerne/bodem-verhouding is 5 gram luzerne per kg bodem (drooggewicht).

1.6.5 **Voorbehandeling van de teststof voordat deze op de bodem wordt gebracht**

De teststof wordt normaal gesproken met behulp van een draagstof opgebracht. Dit kan water zijn (voor in water oplosbare stoffen) of een inerte vaste stof zoals fijn kwartzand (deeltjesgrootte 0,1-0,5 mm). Andere vloeibare draagstoffen dan water (b.v. organische oplosmiddelen zoals aceton of chloroform) moeten worden vermeden omdat deze de microflora kunnen aantasten. Als zand als draagstof wordt gebruikt, kan deze worden gecoat met de in een geschikt oplosmiddel opgeloste of gesuspendeerde teststof. In dat geval moet het oplosmiddel vóór het mengen met de bodem door verdamping worden verwijderd. Voor een optimale verdeling van de teststof in de bodem wordt een verhouding van 10 g zand per kg grond (drooggewicht) aanbevolen. De controlemonsters worden behandeld met uitsluitend een even grote hoeveelheid water en/of kwartzand.

Bij het testen van vluchtige stoffen moeten verliezen tijdens de behandeling zo veel mogelijk worden voorkomen en moet er naar een homogene verdeling in de bodem worden gestreefd (de teststof kan bijvoorbeeld op verschillende plaatsen in de bodem worden geïnjecteerd).

1.6.6 **Testconcentraties**

Als er landbouwchemicaliën worden getest, moeten er ten minste twee concentraties worden gebruikt. De laagste concentratie moet ten minste overeenkomen met de maximale hoeveelheid die naar verwachting in de praktijk in de bodem terecht zal komen, terwijl de hoogste concentratie een veelvoud van de laagste concentratie moet zijn. Bij de berekening van de concentratie van de aan de bodem toegevoegde teststof wordt uitgegaan van een uniforme vermenging in de bodem tot een diepte van 5 cm en een dichtheid van de droge grond van 1,5. Voor landbouwchemicaliën die rechtstreeks op de bodem worden gebracht en voor chemische stoffen waarvoor de hoeveelheid die op de bodem terechtkomt voorspelbaar is, worden als testconcentratie de maximale PEC (predicted environmental concentration) en het vijfvoud van deze concentratie aanbevolen. Stoffen die naar verwachting meer dan een keer per seizoen op de bodem worden gebracht, moeten worden getest bij concentraties die worden berekend door de PEC te vermenigvuldigen met het aantal keren dat dit naar verwachting maximaal gebeurt. De hoogste geteste concentratie mag echter niet hoger zijn dan tien keer de maximale per keer opgebrachte hoeveelheid. Als andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt een meetkundige reeks van ten minste vijf concentraties gebruikt. De geteste concentraties moeten het interval bestrijken dat voor de bepaling van de EC_x-waarden nodig is.

1.7 UITVOERING VAN DE TEST

1.7.1 **Blootstellingsomstandigheden**

1.7.1.1 *Behandeling en controle*

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in drie even zware porties verdeeld. Twee porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof (controle). Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt minimaal een bepaling in triplo aanbevolen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in zes even zware porties verdeeld. Vijf porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof. Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt een bepaling in triplo aanbevolen. Er moet worden gezorgd voor een homogene verdeling van de teststof in de behandelde bodemmonsters. Bij het mengen moeten comprimering en kluitvorming van de grond worden voorkomen.

1.7.1.2 *Incubatie van de bodemmonsters*

Incubatie van de bodemmonsters kan op twee manieren gebeuren : als één monster voor elke behandelde en onbehandelde bodem of als een reeks aparte even grote submonsters voor elke behandelde en onbehandelde bodem. Wanneer vluchtige stoffen worden getest, mag de test echter uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd. Wanneer de grond als één monster wordt geïncubeerd, worden grote hoeveelheden van elke behandelde en onbehandelde bodem geïncubeerd en worden tijdens de test waar nodig submonsters voor analyse genomen. De hoeveelheid die aanvankelijk voor elke behandelde en onbehandelde bodem wordt geïncubeerd, is afhankelijk van de grootte van de submonsters, het aantal replicaatbepalingen dat voor de analyse wordt gebruikt en het verwachte maximale aantal monsternemingstijdstippen. Grond die als één monster wordt geïncubeerd, moet vóór het nemen van submonsters grondig worden gemengd. Wanneer de bodem als een reeks aparte bodemmonsters wordt geïncubeerd, wordt elke portie behandelde en onbehandelde grond in het vereiste aantal submonsters verdeeld, die worden gebruikt wanneer ze nodig zijn. Wanneer bij een experiment meer dan twee monsternemingstijdstippen kunnen worden verwacht, moeten er voldoende submonsters voor alle replicaatbepalingen en alle monsternemingstijdstippen worden gemaakt. Ten minste drie replicaatmonsters van de testbodem worden onder aërobe omstandigheden geïncubeerd (zie punt 1.7.1.1). Tijdens alle tests moeten er geschikte bakken worden gebruikt met voldoende ruimte boven de grond om te voorkomen dat er anaërobe omstandigheden ontstaan. Wanneer er vluchtige stoffen worden getest, mag de test uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd.

1.7.1.3 Testomstandigheden en duur van de test

De test wordt in het donker bij kamertemperatuur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) uitgevoerd. Het vochtgehalte van de bodemmonsters moet gedurende de test op 40-60 % van het maximale watergehalte van de bodem worden gehouden (zie punt 1.6.4.2) met een bereik van $\pm 5\%$. Indien nodig kan gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden toegevoegd.

De minimale duur van een test is 28 dagen. Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de nitraatvorming in behandelde en controlemonsters vergeleken. Als op dag 28 het verschil groter dan 25 % is, wordt de test voortgezet tot het verschil 25 % of minder is maar maximaal gedurende 100 dagen. Voor andere stoffen dan landbouwchemicaliën wordt de test na 28 dagen beëindigd. Op dag 28 wordt de hoeveelheid nitraat in de behandelde en de controlemonsters bepaald en worden de EC_x -waarden berekend.

1.7.2 Monsterneming en analyse van de grond

1.7.2.1 Schema voor de monsterneming

Als er landbouwchemicaliën worden getest, worden de bodemmonsters op de dagen 0, 7, 14 en 28 op nitraat geanalyseerd. Als er een langere test nodig is, wordt na dag 28 om de 14 dagen een analyse uitgevoerd.

Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, worden er ten minste vijf testconcentraties gebruikt en worden de bodemmonsters aan het begin (dag 0) en aan het eind van de blootstellingsperiode (dag 28) op nitraat geanalyseerd. Als dit nodig wordt geacht, kan er bijvoorbeeld op dag 7 een tussentijdse meting worden gedaan. De op dag 28 verkregen gegevens worden gebruikt om de EC_x -waarde voor de chemische stof te bepalen. Als dat gewenst is, kunnen de gegevens van de controlemonsters op dag 0 worden gebruikt om de oorspronkelijke hoeveelheid nitraat in de bodem te bepalen.

1.7.2.2 Analyse van de bodemmonsters

Op elk monsternemingstijdstip wordt in elk replicaatmonster (behandeld en controle) de gevormde hoeveelheid nitraat bepaald. Het nitraat wordt uit de bodem geëxtraheerd door de monsters met een geschikte extractievloeistof, bijvoorbeeld een 0,1 M kaliumchloride-oplossing, te schudden. Een hoeveelheid van 5 ml KCl-oplossing per gram grond (drooggewicht) wordt aanbevolen. Om de extractie te optimaliseren mogen de bakken met grond en extractievloeistof ten hoogste halfvol zijn. De mengsels worden gedurende 60 minuten bij 150 rpm geschud. De mengsels worden gecentrifugeerd of gefiltreerd en de vloeistoffase wordt op nitraat geanalyseerd. Deeltjesvrije vloeibare extracten kunnen vóór analyse maximaal zes maanden bij $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ worden bewaard.

2 GEGEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Als de test met landbouwchemicaliën wordt uitgevoerd, wordt de gevormde hoeveelheid nitraat in elk replicaat-bodemmonster geregistreerd en worden de gemiddelde waarden van alle replicaatbepalingen in tabelvorm vermeld. De omzetting van stikstof wordt met adequate en algemeen erkende statistische methoden (b.v. een F-test, niveau met 5 % significantie) bepaald. De gevormde hoeveelheid nitraat wordt uitgedrukt in mg nitraat/kg drooggewicht bodem/dag. De nitraatvorming bij elke behandelde bodem wordt vergeleken met de controle en de procentuele afwijking van de controle wordt berekend.

Als de test met andere stoffen dan landbouwchemicaliën wordt uitgevoerd, wordt de gevormde hoeveelheid nitraat in elk replicaat-bodemmonster bepaald en wordt er een dosis/respons-curve samengesteld om de EC_x -waarden te bepalen. De hoeveelheid nitraat (in mg nitraat/kg drooggewicht bodem) die na 28 dagen in de behandelde monsters wordt gevonden, wordt vergeleken met de controle. Uit deze gegevens wordt de procentuele remming voor elke testconcentratie berekend. Deze percentages worden uitgezet tegen de concentratie en met behulp van statistische procedures worden de EC_x -waarden berekend. Met behulp van standaardprocedures worden ook de betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,95$) voor de berekende EC_x bepaald (10) (11) (12).

Teststoffen die grote hoeveelheden stikstof bevatten, kunnen bijdragen tot de tijdens de test gevormde hoeveelheid nitraat. Als deze stoffen bij een hoge concentratie worden getest (b.v. stoffen waarvan wordt aangenomen dat ze herhaaldelijk worden opgebracht), moeten er afdoende controles in de test worden opgenomen (d.w.z. bodem met teststof maar zonder plantenmeel). Bij de berekening van de EC_x moet dan rekening worden gehouden met de gegevens van deze controles.

2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Wanneer de resultaten van tests met landbouwchemicaliën worden geëvalueerd en het verschil in de nitraatvorming tussen de laagste concentratie (d.w.z. de maximale verwachte concentratie) en de controle op enig monsternemingstijdstip na dag 28 niet groter dan 25 % is, kan worden geconcludeerd dat het product op lange termijn geen invloed op de omzetting van stikstof in de bodem heeft. Wanneer de resultaten van tests met andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden geëvalueerd, worden de EC_{50} , de EC_{25} en/of de EC_{10} gebruikt.

3 RAPPORTAGE

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Een volledige specificatie van de gebruikte bodem met vermelding van o.a. :

- de geografische kenmerken van de locatie (lengte en breedte);
- informatie over het verleden van de locatie (d.w.z. vegetatie, behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met meststoffen, onopzettelijke verontreinigingen enz.);
- het gebruikspatroon (d.w.z. landbouwgrond, bos enz.);
- de monsternemingsdiepte (in cm);
- het gehalte aan zand/slib/klei (in % drooggewicht);
- de pH (in water);
- het gehalte aan organische koolstof (in % drooggewicht);
- het stikstofgehalte (in % drooggewicht)
- de aanvankelijke nitraatconcentratie (in mg nitraat/kg drooggewicht);
- de kation-uitwisselingscapaciteit (in mmol/kg);
- de microbiële biomassa in percentage totale organische koolstof;
- de referentie van de voor de bepaling van elke parameter gebruikte methode;
- alle informatie over de verzameling en opslag van de bodemmonsters;
- een gedetailleerde beschrijving van de eventuele pre-incubatie van de grond.

De teststof :

- de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;
- de chemische identificatiegegevens, indien relevant, met inbegrip van de structuurformule, de zuiverheid (d.w.z. het percentage werkzaam bestanddeel voor gewasbeschermingsmiddelen) en het stikstofgehalte.

Het substraat :

- de herkomst van het substraat;
- de samenstelling (d.w.z. luzernemeel, luzerne/grasmeel);
- koolstof- en stikstofgehalte (in % drooggewicht);
- maaswijdte van de zeef (in mm).

De testomstandigheden :

- gedetailleerde gegevens over de verbetering van de bodem met organisch substraat;
- het aantal concentraties van de teststof en, indien van toepassing, een motivering voor de keuze van de concentraties;
- gedetailleerde gegevens over de manier waarop de teststof op de bodem wordt gebracht;
- de incubatietemperatuur;
- het vochtgehalte van de bodem aan het begin van en tijdens de test;
- de gebruikte incubatiemethode (d.w.z. in één portie of als een reeks aparte submonsters);
- het aantal replicaatbepalingen;
- de monsternemingstijdstippen;
- de voor de extractie van nitraat uit de bodem gebruikte methode.

De resultaten :

- de voor de nitraatanalyse gebruikte analyseprocedure en -apparatuur;
- de resultaten van de nitraatanalyse, met vermelding van de afzonderlijke en gemiddelde waarden, in tabelvorm;
- de verschillen tussen de replicaatbepalingen bij de behandelde en de controlemonsters;
- een verklaring voor correcties in de berekeningen, indien van toepassing;
- het procentuele verschil in de nitraatvorming op elk monsternemingstijdstip of, indien van toepassing, de EC₅₀-waarde met het 95 %-betrouwbaarheidsinterval, andere EC_x-waarden (d.w.z. EC₂₅ of EC₁₀) met betrouwbaarheidsintervallen en een grafische voorstelling van de dosis/respons-curve;
- de statistische behandeling van de resultaten;
- alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4 REFERENTIES

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7 : Soil Microflora. EPPO Bulletin 24 : 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4 : Soil Quality - Biological Methods.
- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1 : Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2 : Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.22 : MICRO-ORGANISMEN IN DE BODEM : BEPALING VAN DE OMZETTING VAN KOOLSTOF**1 METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 217 (2000) van de OESO.

1.1 INLEIDING

In deze testmethode wordt een laboratoriumtest beschreven om te onderzoeken welke effecten gewasbeschermingsmiddelen en wellicht andere chemische stoffen na één blootstelling op lange termijn kunnen hebben op de omzetting van koolstof door micro-organismen in de bodem. De test is in eerste instantie gebaseerd op aanbevelingen van de Organisatie voor de bescherming van planten in Europa en het Middellandse-Zeegebied (1). Er is echter ook rekening gehouden met andere richtsnoeren, bijvoorbeeld van de Biologische Bundesanstalt in Duitsland (2), het Environmental Protection Agency in de VS (3) en de SETAC (4). Tijdens een workshop van de OESO over de selectie van bodem/sediment in Belgrate in Italië in 1995 (5) is overeenstemming bereikt over het aantal en de aard van de in deze test te gebruiken bodemmonsters. De aanbevelingen voor het verzamelen, behandelen en bewaren van de bodemmonsters zijn gebaseerd op ISO-richtsnoeren (6) en aanbevelingen van de workshop in Belgrate.

Bij de beoordeling en evaluatie van toxische kenmerken van teststoffen kan het nodig zijn de effecten op de microbiële activiteit van de bodem te bepalen, bijvoorbeeld wanneer er gegevens over de potentiële neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen op de microflora van de bodem nodig zijn of wanneer wordt verwacht dat de micro-organismen in de bodem aan andere chemische stoffen dan gewasbeschermingsmiddelen worden blootgesteld. De bepaling van de omzetting van koolstof wordt uitgevoerd om de effecten van deze chemische stoffen op de microflora van de bodem te bepalen. Als er landbouwchemicaliën (b.v. gewasbeschermingsmiddelen, kunstmest of bosbouwchemicaliën) worden getest, worden zowel de bepaling van de omzetting van koolstof als de bepaling van de omzetting van stikstof uitgevoerd. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, volstaat de bepaling van de omzetting van stikstof. Als de EC_{50} bij de bepaling van de omzetting van stikstof voor dergelijke stoffen echter binnen het bereik valt van de waarde die voor in de handel verkrijgbare nitrificatieremmers (zoals nitrapyrin) wordt gevonden, kan een bepaling van de omzetting van koolstof worden uitgevoerd om nadere informatie te verkrijgen.

De bodem bestaat uit levende en niet-levende componenten die complexe en heterogene mengsels kunnen vormen. Micro-organismen spelen een belangrijke rol bij de afbraak en omzetting van organisch materiaal in vruchtbare bodem en veel soorten dragen bij tot verschillende aspecten van de vruchtbaarheid van de bodem. Een verstoring van deze biochemische processen op lange termijn kan mogelijk de cycli van nutriënten verstoren en verandering brengen in de vruchtbaarheid van de bodem. Omzetting van koolstof en stikstof vindt in elke vruchtbare bodem plaats. Hoewel de voor deze processen verantwoordelijke microbiële levensgemeenschappen van bodem tot bodem verschillen, zijn de omzettingroutes in grote lijnen gelijk.

Deze testmethode is bedoeld om te detecteren welke schadelijke effecten een stof op lange termijn op het omzettingsproces van koolstof in aërobe bodem aan het oppervlak kan hebben. De test is gevoelig voor veranderingen in de grootte en activiteit van de microbiële levensgemeenschappen die verantwoordelijk zijn voor de omzetting van koolstof, aangezien deze gemeenschappen daarbij zowel chemische stress als een koolstoftekort ondervinden. Er wordt een zandige bodem met weinig organisch materiaal gebruikt. Deze bodem wordt met de teststof behandeld en geïncubeerd onder omstandigheden die een snel microbiële metabolisme mogelijk maken. Onder deze omstandigheden raken de bronnen van gemakkelijk beschikbare koolstof in de bodem snel uitgeput. Dit leidt tot een koolstoftekort waardoor microbiële cellen enerzijds afsterven en anderzijds aangezet worden tot latentie en/of sporenvorming. Als de test meer dan 28 dagen duurt, kan de som van deze reacties in controles (onbehandelde bodem) worden gemeten als een geleidelijk verlies van metabool actieve microbiële biomassa (7). Als de biomassa in bodem met koolstof-stress onder de testomstandigheden door de aanwezigheid van een chemische stof wordt aangetast, komt deze wellicht niet op hetzelfde niveau terug als in de controles. Dit betekent dat een verstoring door de teststof, ongeacht op welk moment tijdens de test dit gebeurt, vaak tot het einde van de test aanhoudt.

Deze testmethode is ontwikkeld uit tests die in eerste instantie bedoeld waren voor stoffen waarvoor kan worden geraamd welke hoeveelheid de bodem bereikt. Dit geldt bijvoorbeeld voor gewasbeschermingsmiddelen die in bekende hoeveelheden op het veld worden gebracht. Voor landbouwchemicaliën is het voldoende twee doses te testen die relevant zijn voor de opgebrachte hoeveelheid die wordt verwacht of geraamd. Landbouwchemicaliën kunnen als werkzame stof of als geformuleerd product worden getest. Het gebruik van de test blijft echter niet beperkt tot stoffen met een voorspelbare milieuconcentratie. Door zowel de op de bodem gebrachte hoeveelheid teststof als de manier waarop de gegevens worden geëvalueerd, te veranderen, kan de test ook worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor niet bekend is hoeveel er naar verwachting in de bodem terecht zal komen. Daarom worden voor andere stoffen dan landbouwchemicaliën de effecten van een reeks concentraties op de omzetting van koolstof bepaald. De gegevens uit deze tests worden gebruikt om een dosis/respons-curve samen te stellen en EC_x -waarden te berekenen, waarbij x het procentuele effect aangeeft.

1.2 DEFINITIES

Omzetting van koolstof : de afbraak van organisch materiaal door micro-organismen tot het anorganische eindproduct kooldioxide.

EC_x (effectieve concentratie) : de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van koolstof in kooldioxide met x procent.

EC_{50} (mediaan van de effectieve concentratie) : de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van koolstof in kooldioxide met 50 procent.

1.3 REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Gezeefde bodem wordt hetzij behandeld met de teststof, hetzij niet behandeld (controle). Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt aanbevolen minimaal twee concentraties te testen die moeten worden gekozen op grond van de hoogste concentratie die op het veld wordt verwacht. Na 0, 7, 14 en 28 dagen incubatie worden monsters van de behandelde en de controlebodem met glucose gemengd en wordt de door glucose geïnduceerde ademhaling gedurende twaalf uur gemeten. De ademhaling wordt uitgedrukt in vrijgekomen kooldioxide (in mg kooldioxide/kg droge bodem/uur) of verbruikte zuurstof (in mg zuurstof/kg bodem/uur). De gemiddelde ademhaling in de behandelde bodemonsters wordt vergeleken met de controlemonsters en de procentuele afwijking van de behandelde ten opzichte van de controlemonsters wordt berekend. Alle tests duren ten minste 28 dagen. Als op dag 28 het verschil tussen de behandelde en de controlebodem 25 % of groter is, worden de metingen om de veertien dagen voortgezet tot maximaal 100 dagen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de teststof in een reeks concentraties aan de bodemonsters toegevoegd en wordt na 28 dagen de door glucose geïnduceerde ademhaling (d.w.z. de gemiddelde hoeveelheid gevormd kooldioxide of verbruikte zuurstof). De resultaten van tests met een reeks concentraties worden aan regressieanalyse onderworpen en de EC_x -waarden (d.w.z. de EC_{50} , de EC_{25} en/of de EC_{10}) worden berekend. Zie ook de definities.

1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

Bij landbouwchemicaliën wordt de evaluatie van de testresultaten gebaseerd op betrekkelijk kleine verschillen (gemiddeld $\pm 25\%$) tussen het vrijgekomen kooldioxide of de verbruikte zuurstof in (of door) de behandelde en de controlemonsters en grote verschillen in de controles kunnen dan ook tot onjuiste resultaten leiden. Het verschil tussen replicaat-controlemonsters moet derhalve kleiner zijn dan $\pm 15\%$.

1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1 Apparatuur

Er worden testbakken van chemisch inert materiaal gebruikt. Het volume moet geschikt zijn voor de procedure die voor de incubatie van de bodem wordt gebruikt, d.w.z. incubatie in één keer of als een reeks afzonderlijke bodemonsters (zie punt 1.7.1.2). Het waterverlies moet tot een minimum worden beperkt maar gasuitwisseling moet tijdens de test mogelijk zijn (de testbakken kunnen bijvoorbeeld met geperforeerde polyetheenfolie worden afgedekt). Wanneer vluchtige stoffen worden getest, moeten er afsluitbare gasdichte bakken worden gebruikt. Deze moeten zo groot zijn dat het bodemonster ongeveer een kwart van hun volume beslaat.

Voor de bepaling van de door glucose geïnduceerde ademhaling zijn incubatiesystemen en instrumenten voor de meting van het gevormde kooldioxide of de verbruikte zuurstof nodig. Voor voorbeelden van dergelijke systemen en instrumenten wordt naar de literatuur verwezen (8) (9) (10) (11).

1.6.2 Selectie en aantal bodemsoorten

Er wordt één bodemsoort gebruikt. De aanbevolen kenmerken van de bodem zijn :

- zandgehalte : minimaal 50 % en maximaal 75 %;
- pH : 5,5 – 7,5;
- organisch koolstofgehalte : 0,5 – 1,5 %;
- de microbiële biomassa moet worden gemeten (12) (13) en het koolstofgehalte daarvan moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn.

In de meeste gevallen levert een bodem met deze kenmerken de ongunstigste situatie op, aangezien de adsorptie van de teststof tot een minimum wordt beperkt en de beschikbaarheid van de stof voor de flora maximaal is. Een test met andere bodemsoorten is dan ook meestal niet nodig. In bepaalde gevallen, bijvoorbeeld wanneer de teststof naar verwachting vooral bij bepaalde bodemsoorten zoals zure bosgrond zal worden gebruikt of bij elektrostatisch geladen chemische stoffen, kan het echter nodig zijn een andere bodemsoort te gebruiken.

1.6.3 Verzameling en opslag van de bodemonsters

1.6.3.1 Verzameling

Er moet gedetailleerde informatie beschikbaar zijn over de geschiedenis van de locatie waar de testbodem wordt verzameld, zoals de exacte ligging, de vegetatie, de data van behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met organische en anorganische mest, toevoegingen van biologisch materiaal en onopzettelijke verontreinigingen. De voor de verzameling van de bodem gekozen locatie moet op lange termijn kunnen worden gebruikt. Permanente weidegrond en velden met eenjarige graangewassen (behalve mais) of dicht ingezaaide groenbemestingsgewassen zijn geschikt. De gekozen monsternemingsplaats mag gedurende ten minste één jaar vóór de monsterneming niet met gewasbeschermingsmiddelen zijn behandeld. Ook mag er gedurende ten minste zes maanden geen organische mest zijn opgebracht. Het gebruik van anorganische mest is alleen aanvaardbaar wanneer dit in overeenstemming met de eisen van het gewas is en er mogen gedurende ten minste drie maanden na de opbrenging van de mest geen monsters worden genomen. Het gebruik van grond die is behandeld met meststoffen waarvan bekend is dat ze biocide-effecten hebben (b.v. calciumcyanamide) moet worden vermeden.

Gedurende of vlak na lange perioden (meer dan 30 dagen) van droogte of doordrenking van de bodem mogen er geen monsters worden genomen. Bij een omgeploegde bodem moeten de monsters van een diepte van 0 tot 20 cm worden genomen. Bij grasland (weidegrond) of andere bodemsoorten waar gedurende lange perioden (ten minste één teeltseizoen) niet geploegd wordt, kan de maximale monsterdiepte iets groter dan 20 cm (b.v. maximaal 25 cm) zijn. De bakken waarin en de temperatuur waarbij de bodemonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat de oorspronkelijke eigenschappen van de bodem niet significant veranderen.

1.6.3.2 Opslag

Het gebruik van grond die net van het veld komt, verdient de voorkeur. Als opslag in het laboratorium niet kan worden vermeden, kan de grond gedurende maximaal drie maanden in het donker bij 4 ± 2 °C worden bewaard. Tijdens de opslag van grond moet er voor aërobe omstandigheden worden gezorgd. Als de grond wordt verzameld in gebieden waar deze gedurende ten minste drie maanden per jaar bevroert, is opslag gedurende zes maanden bij -18°C mogelijk. Vóór elk experiment wordt de microbiële biomassa van opgeslagen grond gemeten; het koolstofgehalte van de biomassa moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn (zie punt 1.6.2).

1.6.4 Behandeling en voorbereiding van de grond voor de test

1.6.4.1 Pre-incubatie

Als de grond opgeslagen was (zie de punten 1.6.4.2 en 1.7.1.3), wordt pre-incubatie gedurende 2 tot 28 dagen aanbevolen. De temperatuur en het vochtgehalte van de bodem tijdens de pre-incubatie moeten vergelijkbaar zijn met die tijdens de test (zie de punten 1.6.4.2 en 1.7.1.3).

1.6.4.2 Fysisch-chemische kenmerken

De grond wordt met de hand ontdaan van grote voorwerpen (stenen, delen van planten enz.) en zonder overmatig drogen vochtig gezeefd tot een deeltjesgrootte van maximaal 2 mm. Het vochtgehalte van het bodemmonster moet met gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden aangepast tot 40-60 % van het maximale watergehalte.

1.6.5 Voorbehandeling van de teststof voordat deze op de bodem wordt gebracht

De teststof wordt normaal gesproken met behulp van een draagstof opgebracht. Dit kan water zijn (voor in water oplosbare stoffen) of een inerte vaste stof zoals fijn kwartzand (deeltjesgrootte 0,1-0,5 mm). Andere vloeibare draagstoffen dan water (b.v. organische oplosmiddelen zoals aceton of chloroform) moeten worden vermeden omdat deze de microflora kunnen aantasten. Als zand als draagstof wordt gebruikt, kan deze worden gecoat met de in een geschikt oplosmiddel opgeloste of gesuspendeerde teststof. In dat geval moet het oplosmiddel vóór het mengen met de bodem door verdamping worden verwijderd. Voor een optimale verdeling van de teststof in de bodem wordt een verhouding van 10 g zand per kg grond (drooggewicht) aanbevolen. De controlemonsters worden behandeld met uitsluitend dezelfde hoeveelheid water en/of kwartzand.

Bij het testen van vluchtige stoffen moeten verliezen tijdens de behandeling worden voorkomen en moet er naar een homogene verdeling in de bodem worden gestreefd (de teststof kan bijvoorbeeld op verschillende plaatsen in de bodem worden geïnjecteerd).

1.6.6 Testconcentraties

Als er gewasbeschermingsmiddelen of andere chemische stoffen met een voorspelbare milieuconcentratie worden getest, moeten er ten minste twee concentraties worden gebruikt. De laagste concentratie moet ten minste overeenkomen met de maximale hoeveelheid die naar verwachting in de praktijk in de bodem terecht zal komen, terwijl de hoogste concentratie een veelvoud van de laagste concentratie moet zijn. Bij de berekening van de concentratie van de aan de bodem toegevoegde teststof wordt uitgegaan van een uniforme vermenging in de bodem tot een diepte van 5 cm en een dichtheid van de droge grond van 1,5. Voor landbouwchemicaliën die rechtstreeks op de bodem worden gebracht en voor chemische stoffen waarvoor de hoeveelheid die in de bodem terechtkomt voorspelbaar is, worden als testconcentratie de voorspelbare milieuconcentratie (PEC - predictable environmental concentration) en het vijfvoud van deze concentratie aanbevolen. Stoffen die naar verwachting meer dan een keer per seizoen op de bodem worden gebracht, moeten worden getest bij concentraties die worden berekend door de PEC te vermenigvuldigen met het aantal keren dat dit naar verwachting maximaal gebeurt. De hoogste geteste concentratie mag echter niet hoger zijn dan tien keer de maximale per keer opgebrachte hoeveelheid.

Als andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt een meetkundige reeks van ten minste vijf concentraties gebruikt. De geteste concentraties moeten het interval bestrijken dat voor de bepaling van de EC_x-waarden nodig is.

1.7 UITVOERING VAN DE TEST

1.7.1 Blootstellingsomstandigheden

1.7.1.1 Behandeling en controle

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in drie even zware porties verdeeld. Twee porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof (controle). Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt minimaal een bepaling in triplo aanbevolen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in zes even zware porties verdeeld. Vijf porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof. Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt een bepaling in triplo aanbevolen. Er moet worden gezorgd voor een homogene verdeling van de teststof in de behandelde bodemmonsters. Bij het mengen moeten comprimering en kluitvorming van de grond worden voorkomen.

1.7.1.2 Incubatie van de bodemmonsters

Incubatie van de bodemmonsters kan op twee manieren gebeuren : als één monster voor elke behandelde en onbehandelde bodem of als een reeks aparte even grote submonsters voor elke behandelde en onbehandelde bodem. Wanneer vluchtige stoffen worden getest, mag de test echter uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd. Wanneer de grond als één monster wordt geïncubeerd, worden grote hoeveelheden van elke behandelde en onbehandelde bodem geïncubeerd en worden tijdens de test wat nodig submonsters voor analyse genomen. De hoeveelheid die aanvankelijk voor elke behandelde en onbehandelde bodem wordt geïncubeerd, is afhankelijk van de grootte van de submonsters, het aantal replicaatbepalingen dat voor de analyse wordt gebruikt en het verwachte maximale aantal monsternemingstijdstippen. Grond die als één monster wordt geïncubeerd, moet vóór het nemen van submonsters grondig worden gemengd. Wanneer de bodem als een reeks aparte bodemmonsters wordt geïncubeerd, wordt elke portie behandelde en onbehandelde grond in het vereiste aantal submonsters verdeeld, die worden gebruikt wanneer ze nodig zijn. Wanneer bij een experiment meer dan twee monsternemingstijdstippen kunnen worden verwacht, moeten er voldoende submonsters voor alle replicaatbepalingen en alle monsternemingstijdstippen worden gemaakt. Ten minste drie replicaatmonsters van de testbodem worden onder aërobe omstandigheden geïncubeerd (zie punt 1.7.1.1). Tijdens alle tests moeten er geschikte bakken worden gebruikt met voldoende ruimte boven de grond om te voorkomen dat er anaërobe omstandigheden ontstaan. Wanneer er vluchtige stoffen worden getest, mag de test uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd.

1.7.1.3 Testomstandigheden en duur van de test

De test wordt in het donker bij kamertemperatuur (20 ± 2 °C) uitgevoerd. Het vochtgehalte van de bodemonsters moet gedurende de test op 40-60 % van het maximale watergehalte van de bodem worden gehouden (zie punt 1.6.4.2) met een bereik van ± 5 %. Indien nodig kan gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden toegevoegd.

De minimale duur van een test is 28 dagen. Als er landbouwchemicaliën worden getest, worden de hoeveelheden vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in de behandelde en de controlemonsters vergeleken. Als op dag 28 het verschil groter dan 25 % is, wordt de test voortgezet tot het verschil 25 % of minder is maar maximaal gedurende 100 dagen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de test na 28 dagen beëindigd. Op dag 28 worden de hoeveelheden vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in de behandelde en de controlemonsters bepaald en worden de EC_x -waarden berekend.

1.7.2 Monsterneming en analyse van de grond

1.7.2.1 Schema voor de monsterneming

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de door glucose geïnduceerde ademhaling van de bodemonsters op de dagen 0, 7, 14 en 28 bepaald. Als er een langere test nodig is, wordt na dag 28 om de 14 dagen een analyse uitgevoerd.

Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, worden er ten minste vijf testconcentraties gebruikt en wordt de door glucose geïnduceerde ademhaling van de bodemonsters aan het begin (dag 0) en aan het eind van de blootstellingsperiode (dag 28) bepaald. Als dit nodig wordt geacht, kan er bijvoorbeeld op dag 7 een tussentijdse meting worden gedaan. De op dag 28 verkregen gegevens worden gebruikt om de EC_x -waarde voor de chemische stof te bepalen. Als dat gewenst is, kunnen de gegevens van de controlemonsters op dag 0 worden gebruikt om de oorspronkelijke hoeveelheid metabool actieve microbiële biomassa in de bodem te bepalen (12).

1.7.2.2 Meting van de door glucose geïnduceerde ademhaling

Op elk monsternemingstijdstip wordt in elk replicaatmonster (behandeld en controle) de door glucose geïnduceerde ademhaling bepaald. De bodemonsters worden gemengd met een zodanige hoeveelheid glucose dat er onmiddellijk een maximale ademhalingsreactie optreedt. De hoeveelheid glucose die bij een bepaalde bodem nodig is om een maximale ademhalingsreactie te veroorzaken, kan bij een vooronderzoek met een reeks glucoseconcentraties worden bepaald (14). Voor een zandige bodem met 0,5-1,5 % organische koolstof is 2 000 tot 4 000 mg glucose per kg drooggewicht bodem echter meestal voldoende. De glucose kan met schoon kwartszand (10 g zand/kg drooggewicht bodem) tot poeder worden vermalen en homogeen met de bodem worden vermengd.

De met glucose verrijkte bodemonsters worden geïncubeerd in geschikte apparatuur om de ademhaling continu, om het uur of om de twee uur bij 20 ± 2 °C te meten (zie punt 1.6.1). Het vrijgekomen kooldioxide of de verbruikte zuurstof wordt gedurende twaalf uur gemeten en de metingen dienen zo spoedig mogelijk te beginnen, d.w.z. binnen 1 tot 2 uur na de toevoeging van de glucose. De totale hoeveelheid gedurende de twaalf uur vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof wordt gemeten en de gemiddelde ademhaling wordt bepaald.

2 GEGEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de hoeveelheid vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in elk replicaat-bodemonster geregistreerd en worden de gemiddelde waarden van alle replicaatbepalingen in tabelvorm vermeld. De resultaten worden met adequate en algemeen erkende statistische methoden (b.v. een F-test, niveau met 5 % significantie) geëvalueerd. De door glucose geïnduceerde ademhaling wordt uitgedrukt in mg kooldioxide/kg drooggewicht bodem/uur of mg zuurstof/kg drooggewicht bodem/uur. De gemiddelde vorming van kooldioxide of het gemiddelde verbruik van zuurstof bij elke behandelde bodem wordt vergeleken met de controle en de procentuele afwijking van de controle wordt berekend.

Als de test met andere stoffen dan landbouwchemicaliën wordt uitgevoerd, wordt de hoeveelheid vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in elk replicaat-bodemonster bepaald en wordt er een dosis/respons-curve samengesteld om de EC_x -waarden te bepalen. De door glucose geïnduceerde ademhaling (d.w.z. mg kooldioxide/kg drooggewicht bodem/uur of mg zuurstof/kg drooggewicht bodem/uur) die na 28 dagen in de behandelde monsters wordt bepaald, wordt vergeleken met de controle. Uit deze gegevens wordt de procentuele remming voor elke testconcentratie berekend. Deze percentages worden uitgezet tegen de concentratie en met behulp van statistische procedures worden de EC_x -waarden berekend. Met behulp van standaardprocedures worden ook de betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,95$) voor de berekende EC_x bepaald (15) (16) (17).

2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Wanneer de resultaten van tests met landbouwchemicaliën worden geëvalueerd en het verschil in de ademhaling tussen de laagste concentratie (d.w.z. de maximale verwachte concentratie) en de controle op enig monsternemings-tijdstip na dag 28 niet groter dan 25 % is, kan worden geconcludeerd dat het product op lange termijn geen invloed op de omzetting van koolstof in de bodem heeft. Wanneer de resultaten van tests met andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden geëvalueerd, worden de EC_{50} , de EC_{25} en/of de EC_{10} gebruikt.

3 RAPPORTAGE**TESTVERSLAG**

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Een volledige specificatie van de gebruikte bodem met vermelding van o.a. :

- de geografische kenmerken van de locatie (lengte en breedte);
- informatie over het verleden van de locatie (d.w.z. vegetatie, behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met meststoffen, onopzettelijke verontreinigingen enz.);
- het gebruikspatroon (d.w.z. landbouwgrond, bos enz.);
- de monsternemingsdiepte (in cm);
- het gehalte aan zand/slib/klei (in % drooggewicht);
- de pH (in water);
- het gehalte aan organische koolstof (in % drooggewicht);
- het stikstofgehalte (in % drooggewicht)
- de kation-uitwisselingscapaciteit (in mmol/kg);
- de oorspronkelijke microbiële biomassa in percentage totale organische koolstof;
- de referentie van de voor de bepaling van elke parameter gebruikte methode;
- alle informatie over de verzameling en opslag van de bodemonsters;
- een gedetailleerde beschrijving van de eventuele pre-incubatie van de grond.

De teststof :

- de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;
- de chemische identificatiegegevens, indien relevant, met inbegrip van de structuurformule, de zuiverheid (d.w.z. het percentage werkzaam bestanddeel voor gewasbeschermingsmiddelen) en het stikstofgehalte.

De testomstandigheden :

- gedetailleerde gegevens over de verbetering van de bodem met organisch substraat;
- het aantal concentraties van de teststof en, indien van toepassing, een motivering voor de keuze van de concentraties;
- gedetailleerde gegevens over de manier waarop de teststof op de bodem wordt gebracht;
- de incubatietemperatuur;
- het vochtgehalte van de bodem aan het begin van en tijdens de test;
- de gebruikte incubatiemethode (d.w.z. in één portie of als een reeks aparte submonsters);
- het aantal replicaatbepalingen;
- de monsternemingstijdstippen.

De resultaten :

- de voor de meting van de ademhaling gebruikte methode en apparatuur;
- de hoeveelheden kooldioxide of zuurstof, met vermelding van de afzonderlijke en gemiddelde waarden, in tabelvorm;
- de verschillen tussen de replicaatbepalingen bij de behandelde en de controlemonsters;
- een verklaring voor correcties in de berekeningen, indien van toepassing;
- het procentuele verschil in de door glucose geïnduceerde ademhaling op elk monsternemingstijdstip of, indien van toepassing, de EC_{50} met het 95 %-betrouwbaarheidsinterval, andere EC_x -waarden (d.w.z. EC_{25} of EC_{10}) met betrouwbaarheidsintervallen en een grafische voorstelling van de dosis/respons-curve;
- de statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing;
- alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4 REFERENTIES

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7 : Soil Microflora. EPPO Bulletin 24 : 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora ». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3 : 45-60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis - Part 2 : Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41 : 831- 871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality - Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil : Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116 : 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1 : Substrate-induced respiration method.

- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2 : Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbicide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38 : 113-120.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.-

C.23. AËROBE EN ANAËROBE OMZETTING IN DE BODEM

1 METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 307 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Deze testmethode is gebaseerd op bestaande richtsnoeren (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). De hier beschreven methode is bedoeld om de aërobe en anaërobe omzetting van chemische stoffen in de bodem te evalueren. De experimenten zijn bedoeld om te bepalen (i) wat de omzettingssnelheid van de teststof is en (ii) wat de aard en de vormings- en afbraaksnelheid is van omzettingen producten waaraan planten en bodemorganismen kunnen worden blootgesteld. Dergelijke onderzoeken zijn nodig voor chemische stoffen die rechtstreeks op de bodem worden gebracht of waarvan het aannemelijk is dat ze in het bodemmilieu terecht zullen komen. De resultaten van dit laboratorium-onderzoek kunnen ook worden gebruikt voor de ontwikkeling van monsternemings- en analyseprotocollen voor verwant veldonderzoek.

Aëroob en anaëroob onderzoek met één bodemtype is meestal voldoende voor de evaluatie van omzetting routes (8) (10) (11). De omzettingssnelheid moet daarnaast in ten minste drie bodemtypes worden bepaald (8) (10).

In Belgrate (Italië) is in 1995 een OESO-workshop over bodem- en sedimentselectie gehouden (10), waar met name overeenstemming is bereikt over het aantal bodemtypes dat voor deze test moet worden gebruikt. De geteste bodemtypes moeten representatief zijn voor de milieusituatie op de plaats waar de stoffen worden gebruikt of vrijkomen. Zo moeten chemische stoffen die in een subtropisch of tropisch klimaat vrijkomen, met Ferrasols of Nitosols (FAO-systeem) worden getest. De workshop heeft op basis van de ISO-richtsnoeren (15) ook aanbevelingen gedaan voor het verzamelen, behandelen en bewaren van bodemmonsters. Het gebruik van paddy(rijst)-bodem komt in deze methode ook aan de orde.

1.2 DEFINITIES

Teststof : een stof, hetzij de oorspronkelijke verbinding, hetzij relevante omzettingen producten.

Omzettingen producten : alle stoffen die ontstaan bij biotische of abiotische omzettingen reacties van de teststof, met inbegrip van CO₂ en producten in gebonden residuen.

Gebonden residuen : verbindingen in de bodem, in planten of in dieren die na extractie in de vorm van de oorspronkelijke verbinding of de metabolieten/omzettingen producten daarvan in de matrix achterblijven. De extractiemethode mag de verbindingen zelf of de structuur van de matrix niet significant wijzigen. De aard van de binding kan gedeeltelijk worden opgehelderd door extractiemethoden die de matrix wijzigen of door verfijnde analysetechnieken. Tot op heden zijn op deze manier bijvoorbeeld covalente, ionische en sorptiebindingen en insluitingen gesignaleerd. In het algemeen heeft de vorming van gebonden residuen tot gevolg dat de biologische toegankelijkheid en de biologische beschikbaarheid significant afnemen (12) [gewijzigd overgenomen uit IUPAC 1984 (13)].

Aërobe omzetting : reacties die in aanwezigheid van moleculaire zuurstof verlopen (14).

Anaërobe omzetting : reacties die bij uitsluiting van moleculaire zuurstof verlopen (14).

Bodem : een mengsel van anorganische en organische chemische bestanddelen, in het laatste geval bestaande uit verbindingen met een hoog koolstof- en stikstofgehalte en een hoog molecuulgewicht, dat kleine (meestal micro-) organismen bevat. Bodem kan in twee toestanden worden verwerkt :

(a) onverstoorde, zoals in de loop der tijd ontwikkeld, met kenmerkende lagen van verschillende bodemtypes;

(b) verstoorde, zoals meestal aangetroffen in bouwland of wanneer bij deze test gebruikte monsters door graven worden genomen (14).

Mineralisatie : de volledige afbraak van een organische verbinding tot CO₂ en H₂O onder aërobe omstandigheden en CH₄, CO₂ en H₂O onder anaërobe omstandigheden. In de context van deze testmethode betekent mineralisatie, wanneer met ¹⁴C gelabelde verbindingen worden gebruikt, een volledige afbraak waarbij een gelabeld koolstofatoom wordt geoxideerd en een equivalente hoeveelheid ¹⁴CO₂ vrijkomt (14).

Halveringstijd (t_{0,5}) : de tijd die nodig is om 50 % van een hoeveelheid teststof om te zetten, wanneer de omzetting kan worden beschreven door kinetiek van de eerste orde; deze is onafhankelijk van de concentratie.

DT₅₀ (Disappearance Time 50) : de tijd waarin de concentratie van de teststof met 50 % daalt; deze verschilt van de halveringstijd t_{0,5} wanneer de omzetting niet volgens kinetiek van de eerste orde plaatsvindt.

DT₇₅ (Disappearance Time 75) : de tijd waarin de concentratie van de teststof met 75 % daalt.

DT₉₀ (Disappearance Time 90) : de tijd waarin de concentratie van de teststof met 90 % daalt.

1.3 REFERENTIESTOFFEN

Voor de karakterisering en/of identificatie van omzettingen producten met behulp van spectroscopische en chromatografische methoden moeten referentiestoffen worden gebruikt.

1.4 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De methode kan worden gebruikt voor alle chemische stoffen (al dan niet radioactief gelabeld) waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid en gevoeligheid beschikbaar is. Enigszins vluchtige, niet-vluchtige, in water oplosbare en niet in water oplosbare stoffen kunnen worden getest. De test mag niet worden gebruikt voor chemische stoffen met een grote vluchtigheid vanuit de bodem (b.v. fumigatiemiddelen of organische oplosmiddelen) die onder de experimentele omstandigheden tijdens deze test uit de bodem verdwijnen.

1.5 INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

Voor de meting van de omzettingssnelheid kan een al dan niet gelabelde teststof worden gebruikt. Voor de bestudering van de omzettingroute en voor de bepaling van een massabalans is gelabeld materiaal nodig. Labeling met ^{14}C wordt aanbevolen, maar ook het gebruik van andere isotopen zoals ^{13}C , ^{15}N , ^3H of ^{32}P kan nuttig zijn. Het label moet zo veel mogelijk in het meest stabiele gedeelte van het molecuul worden aangebracht¹. De zuiverheid van de teststof moet ten minste 95 % zijn.

Vóór de uitvoering van een test om de aërobe en anaërobe omzetting in de bodem te bepalen moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn :

- (a) de oplosbaarheid in water (methode A.6);
- (b) de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen;
- (c) de dampspanning (methode A.4) en de constante van de wet van Henry;
- (d) de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (methode A.8);
- (e) de chemische stabiliteit in het donker (hydrolyse) (methode C.7);
- (f) de pKa als een molecuul protonering of deprotonering kan ondergaan [OESO-richtsnoer 112] (16).

Ook informatie over de toxiciteit van de teststof voor micro-organismen in de bodem kan nuttig zijn [testmethoden C.21 en C.22] (16).

Er moeten analysemethoden (met inbegrip van methoden voor extractie en clean-up) beschikbaar zijn voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingen producten daarvan.

1.6 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De bodemmonsters worden met de teststof behandeld en worden onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden (bij constante temperatuur en met een constant vochtgehalte van de bodem) in het donker geïncubeerd in kolven van het biometer-type of in doorstroomsystemen. Nadat voldoende tijd is verstreken, worden de bodemmonsters geëxtraheerd en op de oorspronkelijke stof en de omzettingen producten daarvan geanalyseerd. Ook vluchtige producten worden met geschikte absorptie-apparatuur opgevangen om te worden geanalyseerd. Door met ^{14}C gelabeld materiaal te gebruiken kunnen de verschillende mineralisatiesnelheden worden gemeten door het ontstane $^{14}\text{CO}_2$ weg te vangen en kan de massabalans, met inbegrip van de vorming van aan de bodem gebonden residuen, worden bepaald.

1.7 KWALITEITSCRITERIA

1.7.1 Recovery

Door onmiddellijk na de toevoeging van de teststof bodemmonsters ten minste in duplo te extraheren en te analyseren wordt een eerste indicatie verkregen van de herhaalbaarheid van de analysemethode en de uniformiteit van de procedure voor het opbrengen van de teststof. In latere fasen van de experimenten wordt de recovery bepaald aan de hand van de respectieve massabalansen. Voor gelabelde stoffen moet de recovery tussen 90 % en 110 % liggen (8) en voor ongelabelde stoffen tussen 70 % en 110 % (3).

1.7.2 Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode

De herhaalbaarheid van de analysemethode (exclusief de efficiëntie van de extractie in het begin) voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingen producten kan worden gecontroleerd door één extract van een bodemmonster, dat lang genoeg is geïncubeerd voor de vorming van omzettingen producten, in duplo te analyseren.

De aantoonbaarheidsgrens van de analysemethode voor de teststof en voor de omzettingen producten mag niet hoger zijn dan $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ bodem (als teststof) of, indien dit lager is, 1 % van de opgebrachte dosis. De bepaalbaarheidsgrens moet ook worden gespecificeerd.

1.7.3 Nauwkeurigheid van de omzettingen gegevens

Een regressieanalyse van de concentratie van de teststof als functie van de tijd levert de vereiste informatie op over de betrouwbaarheid van de omzettingcurve en maakt het mogelijk de betrouwbaarheidsgrenzen te berekenen voor de halveringstijd (bij kinetiek van de pseudo-eerste orde) of de DT_{50} en, indien van toepassing, de DT_{75} en de DT_{90} .

1.8 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.8.1 Apparatuur en chemicaliën

Incubatiesystemen bestaan in de vorm van statische gesloten systemen of geschikte doorstroomsystemen (7) (17). In de figuren 1 en 2 worden voorbeelden gegeven van respectievelijk een geschikt doorstroomapparaat voor bodemincubatie en een kolf van het biometer-type. Beiden soorten incubatiesystemen hebben hun voordelen en beperkingen (7) (17).

Er is standaard-laboratoriumapparatuur nodig, met name :

- analyse-instrumenten voor bijvoorbeeld GLC, HPLC en TLC, met inbegrip van de nodige detectiesystemen voor de analyse van al dan niet radioactief gelabelde stoffen, of voor de inverse isotoopverduunningsmethode;
- instrumenten voor identificatie (b.v. MS, GC-MS, HPLC-MS of NMR);
- een vloeistofscintillatieteller;
- een oxidator voor de verbranding van radioactief materiaal;
- een centrifuge;
- extractieapparatuur (b.v. centrifugebuizen voor koude extractie en een Soxhlet-apparaat voor continue extractie met reflux);
- instrumenten voor de concentratie van oplossingen en extracten (b.v. een rotatieverdamer);
- een waterbad;
- een mechanisch mengapparaat (b.v. een kneedmachine of een roermotor).

De volgende chemicaliën worden onder andere gebruikt :

- NaOH p.a., $2 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$, of een andere geschikte base (b.v. KOH of ethanolamine);
- H_2SO_4 p.a., $0,05 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$;
- ethyleenglycol p.a.;
- vast absorptiemateriaal zoals natronkalk en polyurethaanproppen;
- organische oplosmiddelen p.a., zoals aceton of methanol;
- scintillatievloeistof.

1.8.2 Het opbrengen van de teststof

Om de teststof aan de bodem toe te voegen en daarin te verdelen kan deze worden opgelost in water (gedeïoniseerd of gedestilleerd) of indien nodig in minimale hoeveelheden aceton of andere organische oplosmiddelen (6) waarin de teststof voldoende oplosbaar en stabiel is. Het gekozen oplosmiddel mag in de gebruikte hoeveelheid echter geen significante invloed op de microbiële activiteit van de bodem hebben (zie de punten 1.5 en 1.9.2-1.9.3). Het gebruik van oplosmiddelen die de microbiële activiteit remmen, zoals chloroform, dichloormethaan en andere gehalogeneerde oplosmiddelen, moet worden vermeden.

De teststof kan ook als vaste stof worden toegevoegd, bijvoorbeeld gemengd met kwartszand (6) of een klein submonster van de testbodem dat aan de lucht gedroogd en gesteriliseerd is. Als de teststof met behulp van een oplosmiddel wordt toegevoegd, moet het oplosmiddel eerst verdampen voordat het submonster met de teststof aan het oorspronkelijke niet-steriele bodemmonster wordt toegevoegd.

Bij algemene chemische stoffen, die voornamelijk via zuiveringsslib/gebruik in de landbouw in de bodem terechtkomen, moet de teststof eerst aan het slib worden toegevoegd, dat dan vervolgens in het bodemmonster wordt gebracht (zie de punten 1.9.2 en 1.9.3).

Het gebruik van geformuleerde producten wordt in de regel niet aanbevolen. Bijvoorbeeld bij slecht oplosbare teststoffen kan het gebruik van geformuleerd materiaal echter een geschikt alternatief zijn.

1.8.3 BODEM

1.8.3.1 Selectie van de bodem

Om de omzettingroute te bepalen kan een representatief bodemtype worden gebruikt: zandig leem, siltig leem, leem of lemig zand [volgens de FAO- en USDA-indeling (18)] met een pH van 5,5-8,0, een organisch koolstofgehalte van 0,5-2,5% en een microbiële biomassa van ten minste 1% van het totale organische koolstofgehalte wordt aanbevolen (10).

Voor het onderzoek naar de omzettingssnelheid moeten ten minste drie aanvullende bodemtypes worden gebruikt die een scala van relevante bodemtypes vormen. Het organisch koolstofgehalte, de pH, het kleigehalte en de microbiële biomassa van de bodemtypes moeten uiteenlopen (10).

Van alle bodemtypes moeten in elk geval de textuur (% zand, % silt en % klei) [volgens de FAO- en USDA-indeling (18)], de pH, de kation-uitwisselingscapaciteit, het organisch koolstofgehalte, de dichtheid van de droge grond, de waterretentie-kenmerken² en de microbiële biomassa (uitsluitend voor aëroob onderzoek) worden bepaald. Aanvullende informatie over de eigenschappen van de bodem kan nuttig zijn bij de interpretatie van de resultaten. Voor de bepaling van de bodemkenmerken kunnen de in de referenties (19) (20) (21) (22) (23) aanbevolen methoden worden gebruikt. De microbiële biomassa dient met de SIR-methode (substraat-geïnduceerde ademhaling) (25) (26) of met andere methoden (20) te worden bepaald.

1.8.3.2 Verzameling, behandeling en opslag van de bodemmonsters

Er moet gedetailleerde informatie beschikbaar zijn over de geschiedenis van de locatie waar de testbodem wordt verzameld, zoals de exacte ligging, de vegetatie, behandelingen met chemische stoffen, behandelingen met organische en anorganische mest, toevoegingen van biologisch materiaal of andere verontreinigingen. Als de bodem in de loop van de voorgaande vier jaar met de teststof of structureel analoge verbindingen daarvan is behandeld, mag deze niet voor het omzettingsonderzoek worden gebruikt (10) (15).

De grond moet vers van het veld (van de A-horizont of de toplaag van 20 cm) worden verzameld met een bodemwatergehalte dat zeven gemakkelijker maakt. Voor andere bodem dan paddy-velden moet monsterneming niet gedurende of vlak na lange perioden (>30 dagen) van droogte, vorst of overstroming gebeuren (14). De monsters moeten zodanig worden vervoerd dat veranderingen in het bodemwatergehalte tot een minimum worden beperkt, en zo veel mogelijk in het donker worden bewaard op een plaats waar er lucht bij kan komen. Een losjes dichtgeknoopte polyetheen zak is hier in het algemeen geschikt voor.

De grond moet zo spoedig mogelijk na monsterneming worden verwerkt. Vegetatie, groot formaat bodemfauna en stenen moeten worden verwijderd voordat de grond door een zeef van 2 mm wordt gezeefd om kleine stenen en resten van planten en dieren te verwijderen. Voordat de grond wordt gezeefd, mag deze niet te veel worden gedroogd en platgedrukt (15).

Wanneer het in de winter moeilijk is om in het veld monsters te nemen (bevroren bodem of een laag sneeuw), kunnen deze worden genomen van een partij grond die in een kas, bedekt door vegetatie (bijvoorbeeld gras of een gras/klaver-mengsel), wordt bewaard. Er is een duidelijke voorkeur voor onderzoek met vers van het veld gehaalde grond, maar als de verzamelde en bewerkte grond vóór het begin van het onderzoek moet worden opgeslagen, moeten de omstandigheden adequaat zijn en mag dit slechts een beperkte tijd gebeuren (4 ± 2 °C gedurende maximaal drie maanden) om de microbiële activiteit op peil te houden³. Voor gedetailleerde instructies voor de verzameling, behandeling en opslag van grond die voor biotransformatie-experimenten moet worden gebruikt, wordt verwezen naar (8) (10) (15) (26) (27).

Voordat de bewerkte grond voor de test wordt gebruikt, wordt deze gepre-incubeerd om ontkieming en de verwijdering van zaden mogelijk te maken en om het evenwicht van het microbiële metabolisme na de overgang van de monsternemings- en opslagomstandigheden naar de incubatie-omstandigheden te herstellen. Een pre-incubatieperiode van 2 tot 28 dagen met bij benadering de temperatuur en de vochtomstandigheden van de echte test volstaat in het algemeen (15). De opslag en de pre-incubatie mogen samen niet langer dan drie maanden duren.

1.9 UITVOERING VAN DE TEST

1.9.1 Testomstandigheden

1.9.1.1 Testtemperatuur

Gedurende de hele testperiode moet de grond in het donker worden geïncubeerd bij een constante temperatuur die representatief is voor de klimaatomstandigheden waar de teststof zal worden gebruikt of zal vrijkomen. Voor alle teststoffen die in een gematigd klimaat in de bodem terecht kunnen komen, wordt een temperatuur van 20 ± 2 °C aanbevolen. De temperatuur moet worden gemonitord.

Voor chemische stoffen die in een kouder klimaat worden gebruikt of vrijkomen (bijvoorbeeld in noordelijke landen of in de herfst of de winter), moeten daarnaast ook bodemmonsters bij een lagere temperatuur (bijvoorbeeld 10 ± 2 °C) worden geïncubeerd.

1.9.1.2 Vochtgehalte

Voor omzettingproeven onder aërobe omstandigheden moet het vochtgehalte van de bodem⁴ op een pF tussen 2,0 en 2,5 worden gebracht en gehouden (3). Het vochtgehalte van de bodem wordt uitgedrukt als massa water per massa droge grond en moet periodiek worden gecontroleerd (bijvoorbeeld om de twee weken) door de incubatiekolven te

wegen en waterverliezen moeten worden gecompenseerd door water toe te voegen (bij voorkeur steriel gefilterd kraanwater). Er moet op worden gelet dat bij het toevoegen van vocht (eventuele) verliezen van de teststof en/of omzettingen producten door vervluchtiging en/of afbraak onder invloed van licht worden voorkomen of tot een minimum worden beperkt.

Voor omzettingenproeven onder anaërobe of paddy-omstandigheden wordt de grond onder water gezet om deze met water te verzadigen.

1.9.1.3 *Aërobe incubatie-omstandigheden*

In de doorstroomsystemen worden de omstandigheden aëroob gehouden door periodiek met bevochtigde lucht te spoelen of daar continu mee te ventileren. In de biometerkolven vindt de uitwisseling van lucht door diffusie plaats.

1.9.1.4 *Steriele aërobe omstandigheden*

Om informatie te krijgen over de relevantie van de abiotische omzetting van een teststof kunnen bodemmonsters worden gesteriliseerd (zie de referenties 16 en 29 voor sterilisatiemethoden), behandeld met steriele teststof (bijvoorbeeld door de oplossing via een steriel filter toe te voegen) en belucht met bevochtigde steriele lucht zoals beschreven onder punt 1.9.1.3. Voor paddy-bodem moeten grond en water worden gesteriliseerd en moet de incubatie volgens punt 1.9.1.6 worden uitgevoerd.

1.9.1.5 *Anaërobe incubatie-omstandigheden*

Om anaërobe omstandigheden te krijgen en te houden wordt de met de teststof behandelde grond gedurende 30 dagen of, indien dit korter is, één halveringstijd of DT_{50} , onder aërobe omstandigheden geïncubeerd en vervolgens met water doordrenkt (waterlaag van 1-3 cm) en wordt het incubatiesysteem met een inert gas (bijvoorbeeld stikstof of argon) doorgespoeld⁹. Het testsysteem moet mogelijkheden bieden voor de meting van bijvoorbeeld de pH, de zuurstofconcentratie en de redoxpotentiaal en apparatuur bevatten voor het wegvangen van vluchtige producten. Het systeem van het biometer-type moet gesloten zijn om te voorkomen dat door diffusie lucht binnendringt.

1.9.1.6 *Paddy-incubatieomstandigheden*

Om de omzetting in paddy-rijstbodem te onderzoeken wordt de bodem onder water gezet met een waterlaag van ongeveer 1-5 cm en wordt de teststof aan de waterfase toegevoegd (9). Een bodemdiepte van ten minste 5 cm wordt aanbevolen. Het systeem wordt net als onder aërobe omstandigheden met lucht geventileerd. De pH, de zuurstofconcentratie en de redoxpotentiaal van de waterlaag worden gemonitord en gerapporteerd. Voordat de omzettingenproef wordt begonnen, is een pre-incubatieperiode van minimaal twee weken nodig (zie punt 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Duur van de test*

Het onderzoek naar snelheid en route mag normaal gesproken niet langer duren dan 120 dagen⁶ (3) (6) (8), omdat daarna in een kunstmatig laboratoriumsysteem, dat van natuurlijke aanvulling afgesloten is, in de loop der tijd een daling van de microbiële activiteit van de bodem kan worden verwacht. Wanneer dit nodig is om de afbraak van de teststof en de vorming en afbraak van belangrijke omzettingenproducten te karakteriseren, kan het onderzoek gedurende langere tijd (bijvoorbeeld 6 of 12 maanden) worden voortgezet (8). Voor langere incubatieperiodes moet in het testverslag een motivering worden gegeven en in dat geval moet gedurende en aan het eind van deze perioden de biomassa worden gemeten.

1.9.2 **Uitvoering van de test**

In elke incubatiekolf (zie de figuren 1 en 2 in bijlage 3) wordt ongeveer 50 tot 200 g grond (drooggewicht) gebracht, die volgens een van de onder punt 1.8.2 beschreven methoden met de teststof wordt behandeld. Wanneer er voor de toevoeging van de teststof organische oplosmiddelen worden gebruikt, moeten deze door verdamping uit de grond worden verwijderd. Vervolgens wordt de grond met een spatel en/of door de kolf te schudden grondig gemengd. Als het onderzoek onder paddy-omstandigheden wordt uitgevoerd, worden de grond en het water na de toevoeging van de teststof grondig gemengd. Kleine porties (bijvoorbeeld 1 g) van de behandelde grond worden op de teststof geanalyseerd om te controleren of deze uniform verdeeld is. Alternatieve methoden komen later aan de orde.

De toegevoegde hoeveelheid moet overeenkomen met de grootste hoeveelheid van een gewasbeschermingsmiddel die in de gebruiksaanwijzing voor opbrenging wordt aanbevolen en een uniforme vermenging tot een adequate diepte op het veld (bijvoorbeeld de bovenste laag van 10 cm van de bodem⁷). Voor chemische stoffen die bijvoorbeeld op het blad of zonder vermenging op de bodem worden opgebracht, moet bij de berekening van de hoeveelheid die aan elke kolf moet worden toegevoegd, worden uitgegaan van een diepte van 2,5 cm. Voor chemische stoffen die met de grond worden vermengd, is de adequate diepte de in de gebruiksaanwijzing vermelde vermengingsdiepte. Voor algemene chemische stoffen wordt de opgebrachte hoeveelheid bepaald op basis van de meest relevante aanvoerroute; als bijvoorbeeld zuiveringsslib de belangrijkste route voor de toevoer naar de bodem is, moet de chemische stof aan het slib worden toegevoegd in een concentratie die overeenkomt met de verwachte concentratie in het slib en moet de hoeveelheid aan de grond toegevoegd slib overeenkomen met de normale hoeveelheid op landbouwgrond gebruikt slib. Als deze concentratie niet hoog genoeg is om belangrijke omzettingenproducten te bepalen, kan incubatie van aparte bodemmonsters met grotere hoeveelheden nuttig zijn, maar te grote hoeveelheden die de microbiële functies van de bodem beïnvloeden, moeten worden vermeden (zie de punten 1.5 en 1.8.2).

Ook kan een grotere hoeveelheid (d.w.z. 1 tot 2 kg) grond met de teststof worden behandeld, zorgvuldig in een geschikt mengapparaat worden gemengd en vervolgens in kleine porties van 50 tot 200 g in de incubatiekolven worden overgebracht (bijvoorbeeld met behulp van monsterverdelers). Kleine porties (bijvoorbeeld 1 g) van de behandelde grond worden op de teststof geanalyseerd om te controleren of deze uniform verdeeld is. Een dergelijk procedure verdient de voorkeur aangezien daarmee een uniformere verdeling van de teststof in de bodem mogelijk is.

Ook onbehandelde bodemmonsters worden onder dezelfde (aërobe) omstandigheden als de met de teststof behandelde monsters geïncubeerd. Deze monsters worden gebruikt voor de meting van de biomassa gedurende en aan het eind van het onderzoek.

Wanneer de teststof voor de toevoeging aan de bodem in een of meer organische oplosmiddelen wordt opgelost, worden met dezelfde hoeveelheid oplosmiddel(en) behandelde bodemmonsters worden onder dezelfde (aërobe) omstandigheden als de met de teststof behandelde monsters geïncubeerd. Deze monsters worden gebruikt voor de meting van de biomassa aan het begin, gedurende en aan het eind van het onderzoek om na te gaan welke effecten de organische oplosmiddelen op de microbiële biomassa hebben.

De kolven met de behandelde bodemmonsters worden aan het in figuur 1 beschreven doorstroomsysteem bevestigd of met de in figuur 2 afgebeelde absorptiekolom afgesloten (zie bijlage 3).

1.9.3 Monsterneming en meting

Op geschikte tijdstippen worden incubatiekolven in duplo verwijderd en worden de bodemmonsters met geschikte oplosmiddelen met een verschillende polariteit geëxtraheerd en op de teststof en/of omzettingenproducten geanalyseerd. In een goed opgezet onderzoek zijn er voldoende kolven om op elk monsternemingstijdstip twee kolven te kunnen gebruiken. Ook de absorptieoplossingen of het vaste absorptiemateriaal worden op verschillende tijdstippen (gedurende de eerste maand om de 7 dagen en daarna om de 17 dagen) gedurende en aan het eind van de incubatie van elk bodemmonster verwijderd en op vluchtige producten geanalyseerd. Naast een bodemmonster dat direct na de toevoeging wordt genomen (dag 0), worden nog ten minste 5 andere monsternemingspunten gekozen. De tijdstippen worden zodanig gekozen dat het verloop van de afbraak van de teststof en van de vorming en afbraak van de omzettingenproducten kan worden bepaald (bijvoorbeeld na 0, 1, 3 en 7 dagen, na 2 en 3 weken, na 1, 2 en 3 maanden enz.).

Wanneer een met ^{14}C gelabelde teststof wordt gebruikt, wordt de niet-extraheerbare radioactiviteit door verbranding kwantitatief bepaald en wordt er voor elk monsternemingstijdstip een massabalans bepaald.

Bij anaërobie en paddy-incubatie worden de bodem- en de waterfase gezamenlijk op de teststof en de omzettingenproducten geanalyseerd of vóór extractie en analyse door filtratie of centrifugeren gescheiden.

1.9.4 Facultatieve tests

Aërobie niet-steriele proeven bij andere temperaturen en vochtgehalten van de bodem kunnen nuttig zijn om de invloed van de temperatuur en het vochtgehalte van de bodem op de omzettingssnelheid van een teststof en/of de omzettingenproducten daarvan in de bodem te bepalen.

Met behulp van bijvoorbeeld superkritische vloeistofextractie kan worden getracht de niet-extraheerbare radioactiviteit nader te karakteriseren.

2 GEGEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Voor elk monsternemingstijdstip wordt de hoeveelheid teststof, omzettingenproducten, vluchtige stoffen (uitsluitend in %) en niet-extraheerbaar materiaal als percentage van de oorspronkelijk toegevoegde concentratie en eventueel als $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ bodem (op basis van het drooggewicht) vermeld. Voor elk monsternemingstijdstip dient er een massabalans te worden gegeven als percentage van de oorspronkelijk toegevoegde concentratie. Door in een grafiek de concentratie van de teststof uit te zetten tegen de tijd kan de halveringstijd of de DT_{50} worden bepaald. Belangrijke omzettingenproducten moeten worden geïdentificeerd en ook hun concentratie moet tegen de tijd worden uitgezet om hun vormings- en afbraaksnelheid aan te geven. Een belangrijk omzettingenproduct is een product dat op enig moment tijdens het onderzoek in een grotere hoeveelheid dan 10 % van de toegevoegde dosis aanwezig is.

De weggevangen vluchtige producten geven een indicatie van het vervluchtigingsvermogen van een teststof en de omzettingenproducten daarvan vanuit de bodem.

Er moet een nauwkeuriger bepaling van de halveringstijd of de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} worden verkregen door de nodige kinetische modelberekeningen uit te voeren. Naast de halveringstijd en de DT_{50} wordt er ook een beschrijving van het gebruikte model gegeven met vermelding van de orde van de kinetiek en de determinatiecoëfficiënt (r^2). Kinetiek van de eerste orde krijgt de voorkeur, tenzij $r^2 < 0,7$. Eventueel moeten de berekeningen ook worden toegepast op de belangrijke omzettingenproducten. Voorbeelden van geschikte modellen worden beschreven in de referenties 31 tot en met 35.

Wanneer onderzoek bij verschillende temperaturen wordt uitgevoerd, wordt de omzettingssnelheid binnen het experimentele temperatuurtraject als functie van de temperatuur beschreven met behulp van de vergelijking van Arrhenius :

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ of } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

waarbij $\ln A$ en B regressiecoëfficiënten zijn van respectievelijk het intercept en de helling van een best passende rechte die voortkomt uit een lineaire regressie van $\ln k$ tegen $1/T$, k de snelheidsconstante bij temperatuur T is en T de temperatuur in Kelvin is. Er moet goed worden gelet op het beperkte temperatuurtraject waarop de vergelijking van Arrhenius geldig is wanneer de omzetting door de microbiële activiteit wordt bepaald.

2.2 EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Hoewel het onderzoek in een kunstmatig laboratoriumsysteem wordt uitgevoerd, kan aan de hand van de resultaten een raming worden gemaakt van de omzettingssnelheid van de teststof en de vormings- en afbraaksnelheid van de omzettingenproducten onder veldomstandigheden (36) (37).

Een onderzoek naar de omzettingroute van een teststof levert informatie op over de manier waarop de structuur van de gebruikte stof in de bodem onder invloed van chemische en microbiële reacties verandert.

3 RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

De teststof :

- de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule (waarin de plaats van het label wordt aangegeven als radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt) en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie punt 1.5);
- de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;
- de radiochemische zuiverheid van een radioactief gelabelde stof en de specifieke activiteit (indien van toepassing).

Referentiestoffen :

- de chemische naam en de structuur van referentiestoffen die voor de karakterisering en/of de identificatie van omzettingenproducten worden gebruikt.

De gebruikte bodem :

- gegevens over de plaats waar de monsters zijn verzameld;
- de datum van monsterneming en de gevolgde procedure;
- eigenschappen van de bodem zoals de pH, het organisch koolstofgehalte, de textuur (% zand, % silt, % klei), de kation-uitwisselingscapaciteit, de dichtheid van de droge bodem, de waterretentie-kenmerken en de microbiële biomassa;

- de periode gedurende welke en de omstandigheden waaronder de monsters zijn opgeslagen (als ze zijn opgeslagen).

De testomstandigheden :

- de data waarop het onderzoek is uitgevoerd;
- de gebruikte hoeveelheid teststof;
- de gebruikte oplosmiddelen en de manier waarop de teststof is opgebracht;
- het gewicht van de oorspronkelijk behandelde bodem waaruit op elk analysetijdstip een monster is genomen;
- een beschrijving van het gebruikte incubatiesysteem;
- de stroomsnelheid van de lucht (alleen voor doorstroomsystemen);
- de temperatuur van de proefopstelling;
- het vochtgehalte van de bodem tijdens de incubatie;
- de microbiële biomassa aan het begin, gedurende en aan het eind van het aërobe onderzoek;
- de pH, de zuurstofconcentratie en de redoxpotentiaal aan het begin, gedurende en aan het eind van het anaërobe en paddy-onderzoek;
- de extractiemethode(n);
- de methoden voor de kwalitatieve en kwantitatieve analyse van de teststof en de belangrijke omzettingen-producten in de bodem en het absorptiemateriaal;
- het aantal replicaat-bepalingen en het aantal controlebepalingen.

De resultaten :

- de resultaten van de bepaling van de microbiële activiteit;
- de herhaalbaarheid en gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden;
- de recovery (onder punt 1.7.1 wordt vermeld welke percentages voor een geldig onderzoek gehaald moeten worden);
- tabellen met de resultaten, uitgedrukt als percentage van de gebruikte aanvankelijke dosis en eventueel in mg x kg⁻¹ bodem (drooggewicht);
- de massabalans gedurende en aan het eind van het onderzoek;
- de karakterisering van de niet-extraheerbare (gebonden) radioactiviteit of residuen in de bodem;
- een kwantificering van het vrijgekomen CO₂ en andere vluchtige verbindingen;
- curves waarin voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingenproducten de bodemconcentratie tegen de tijd wordt uitgezet;
- de halveringstijd of de DT₅₀, DT₇₅ en DT₉₀ voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingenproducten, met vermelding van de betrouwbaarheids grenzen;
- een raming van de abiotische afbraaksnelheid onder steriele omstandigheden;
- een evaluatie van de omzettingenkinetiek voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingenproducten;
- de voorgestelde omzettingenroutes, indien van toepassing;
- een bespreking en interpretatie van de resultaten;
- de onbewerkte gegevens (d.w.z. voorbeelden van chromatogrammen en van berekeningen van de omzettingssnelheid en de middelen die voor de identificatie van de omzettingenproducten zijn gebruikt).

4 REFERENTIES

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry : Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Europese Unie (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A : Fate and Behaviour in the Environment.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G : Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil - Part 1 : Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF - Japan 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) DFG : Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts : Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) OECD Test Guideline 304 A : Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)
- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality - Sampling - Part 6 : Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Annex V to Dir. 67/548/EEC
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems) : Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26 :305 (1962).

- (19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1 : Substrate-induced respiration method. Part 2 : fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment : Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.
- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.
- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium : Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In »Environmental Dynamics of Pesticides ». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 39, 188-204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 33, 47-60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.
- (37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

—————
Nota's

- (1) Als de teststof bijvoorbeeld één ring bevat, moet deze ring worden gelabeld; als de teststof twee of meer ringen bevat, kan er apart onderzoek nodig zijn om te bekijken wat er met elke gelabelde ring gebeurt en om bruikbare informatie over de vorming van omzettingproducten te verkrijgen.
- (2) De waterretentie-kenmerken van een bodemtype kunnen worden gemeten als de veldcapaciteit, het waterhoudend vermogen of de waterspanning (pF). Zie bijlage I voor een uitleg. In het testverslag moet worden vermeld of de waterretentie-kenmerken en de dichtheid van de droge grond in onverstoorde of verstoorde (bewerkte) veldmonsters zijn bepaald.
- (3) Recente onderzoekresultaten wijzen erop dat ook grond uit gematigde zones zonder een significant verlies van microbiële activiteit gedurende meer dan drie maanden bij -20°C kan worden bewaard (28) (29).
- (4) De grond mag niet te nat en niet te droog zijn om een afdoende beluchting en voeding van de microflora in de bodem te waarborgen. Als vochtgehalte voor een optimale microbiële groei wordt een waterhoudend vermogen (WHV) van 40-60 % en een waterspanning van 0,1-0,33 bar aanbevolen (6). Dit laatste interval komt overeen met een pF van 2,0-2,5. In bijlage 2 wordt voor verschillende bodemtypes het karakteristieke vochtgehalte vermeld.
- (5) Aan het bodemoppervlak en zelfs daaronder heersen meestal aërobe omstandigheden, zoals is gebleken uit een onderzoekproject in opdracht van de EU [K. Takagi et al. (1992) : Microbial diversity and activity in subsoils : Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 augustus 1992, Sigtuna, Zweden]. Anaërobe omstandigheden komen slechts sporadisch voor wanneer de bodem na zware regenval doordrenkt is of wanneer in rijstvelden paddy-omstandigheden heersen.
- (6) Aëroob onderzoek kan al lang vóór de 120 dagen worden beëindigd, mits de uiteindelijke omzettingroute en de uiteindelijke mineralisatie op dat moment duidelijk bereikt zijn. Beëindiging van de test is mogelijk na 120 dagen of wanneer ten minste 90 % van de teststof is omgezet, maar alleen als ten minste 5 % CO₂ is gevormd.
- (7) De aanvankelijke concentratie op basis van het oppervlak wordt als volgt berekend :

$$C_{\text{bodem}} [\text{mg/kg}_{\text{bodem}}] = \frac{A [\text{kg/ha}] 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] d [\text{kg}_{\text{bodem}}/\text{m}^3]}$$

C_{bodem} = aanvankelijke concentratie in de bodem [mg·kg⁻¹].

A = opgebrachte hoeveelheid [kg·ha⁻¹]; l = dikte van de bodemlaag [m]; d = dichtheid van de droge bodem [kg·m⁻³].

Als vuistregel geldt dat een opgebrachte hoeveelheid van 1 kg·ha⁻¹ tot een bodemconcentratie van ongeveer 1 mg·kg⁻¹ in een laag van 10 cm leidt (uitgaande van een dichtheid van de droge bodem van 1 g·cm⁻³).

BIJLAGE 1

WATERDRUK, VELDCAPACITEIT (VC) EN WATERHOUDEND VERMOGEN (WHV)(1)

Hoogte van de waterkolom [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Opmerkingen
10 ⁷	7	10 ⁴	Droge bodem
1,6·10 ⁴	4,2	16	Verwelkingspunt
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6·10 ²	2,8	0,6	} Bereik van de veldcapaciteit ^(d)
3,3·10 ²	2,5	0,33 ^(c)	
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHV (bij benadering)
1	0	0,001	Met water verzadigde bodem

^(a) pF = log hoogte waterkolom in cm.

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

^(c) Komt overeen met een watergehalte van ongeveer 10% in zand, 35% in leem en 45% in klei.

^(d) De veldcapaciteit is niet constant maar varieert van bodemtype tot bodemtype tussen pF 1,5 en 2,5.

De *waterdruk* wordt als hoogte van de waterkolom in cm of in bar gemeten. Vanwege het grote bereik van de zuigspanning wordt eenvoudigheidshalve de pF-waarde gebruikt, de logaritme van de hoogte van de waterkolom in cm.

De *veldcapaciteit* wordt gedefinieerd als de hoeveelheid water die door een natuurlijke bodem twee dagen na een langdurige regenperiode of afdoende irrigatie tegen de zwaartekracht in kan worden vastgehouden. Deze grootte wordt in situ op het veld in onverstoorde grond bepaald. De meting is dus niet van toepassing op laboratorium-bodemmonsters die wel verstoord zijn. De in verstoorde grond bepaalde VC-waarde kan een sterke systematische variatie vertonen.

Het *waterhoudend vermogen* (WHV) wordt in het laboratorium met verstoorde en onverstoorde grond bepaald door een bodemkolom via capillair transport met water te verzadigen. Het WHV is vooral voor verstoorde grond nuttig en kan wel 30% hoger liggen dan de veldcapaciteit (1). Het WHV is experimenteel ook gemakkelijker te bepalen dan een betrouwbare VC-waarde.

- (1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

BIJLAGE 2

VOCHTGEHALTE VAN DE BODEM (in g water per 100 g droge grond) VAN VERSCHILLENDE BODEMSOORTEN UIT VERSCHILLENDE LANDEN

Bodemtype	Land	Vochtgehalte van de bodem bij		
		WHV ¹	pF = 1,8	pF = 2,5
Zand	Duitsland	28,7	8,8	3,9
Lemig zand	Duitsland	50,4	17,9	12,1
Lemig zand	Zwitserland	44,0	35,3	9,2
Siltig leem	Zwitserland	72,8	56,6	28,4
Kleileem	Brazilië	69,7	38,4	27,3
Kleileem	Japan	74,4	57,8	31,4
Zandig leem	Japan	82,4	59,2	36,0
Siltig leem	VS	47,2	33,2	18,8
Zandig leem	VS	40,4	25,2	13,3

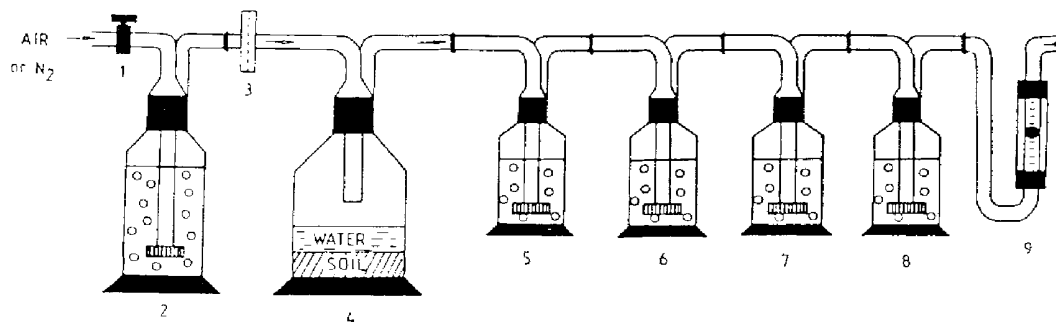
¹ Waterhoudend vermogen

BIJLAGE 3

Figuur 1

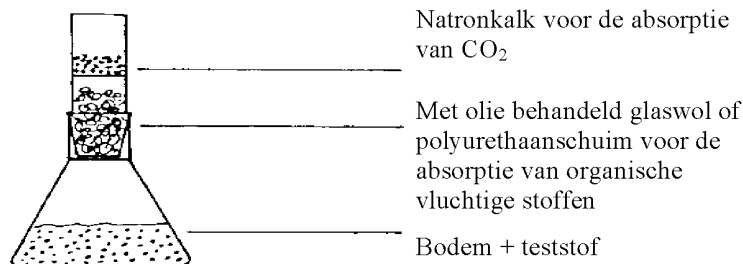
Voorbeeld van een doorstroomapparaat voor de bestudering van de omzetting van chemische stoffen in de bodem (1)(2)

- | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1: naaldventiel | 4: bodemmetabolisme-kolf (alleen voor anaërobe en paddy-omstandigheden met waterlaag) | 7, 8: natriumhydroxide-val voor CO ₂ en andere zure vluchtige stoffen |
| 2: gaswasfles met water | 5: ethyleenglycol-val voor organische vluchtige stoffen | 9: stromingsmeter |
| 3: ultramembraan (alleen voor steriele omstandigheden), poriegrootte 0,2 µm | 6: zwavelzuur-val voor alkalische vluchtige stoffen | |



Figuur 2

Voorbeeld van een kolf van het biometer-type voor de bestudering van de omzetting van chemische stoffen in de bodem (3)



- (1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

C.24. AËROBE EN ANAËROBE OMZETTING IN AQUATISCHE SEDIMENTSISTEMEN

1 METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 308 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Chemische stoffen kunnen bijvoorbeeld rechtstreeks, door overwaaien bij het spuiten, door afspoeling, door drainage, door afvalverwijdering, in industrieel, huishoudelijk of agrarisch afvalwater of door depositie uit de lucht in ondiepe of diepe oppervlaktewateren terecht komen. In deze testmethode wordt een laboratoriumprocedure beschreven voor de bepaling van de aërobe en anaërobe omzetting van organische stoffen in aquatische sedimentsystemen. De methode is gebaseerd op bestaande richtsnoeren (1) (2) (3) (4) (5) (6). In Belgirate (Italië) is in 1995 een OESO-workshop over bodem- en sedimentselectie gehouden (7), waar met name overeenstemming is bereikt over het aantal sedimenttypes dat voor deze test moet worden gebruikt. De workshop heeft op basis van de ISO-richtsnoeren (8) ook aanbevelingen gedaan voor het verzamelen, behandelen en bewaren van sedimentmonsters. Dergelijke onderzoeken zijn nodig voor chemische stoffen die direct aan water worden toegevoegd of waarvan het aannemelijk is dat ze via bovengenoemde routes in het aquatisch milieu terecht zullen komen.

De omstandigheden in natuurlijke aquatische sedimentsystemen zijn in de bovenstaande waterfase vaak aëroob. De bovenste laag van het sediment kan aëroob of anaëroob zijn, terwijl het diepere sediment meestal anaëroob is. Om al deze mogelijkheden te omvatten worden in dit document zowel aërobe als anaërobe tests beschreven. Bij de aërobe test wordt een aërobe waterkolom boven een aërobe sedimentlaag met daaronder een anaërobe gradiënt gesimuleerd. Bij de anaërobe test wordt een volledig anaëroob water/sedimentsysteem gesimuleerd. Als de omstandigheden erop wijzen dat er significant van deze aanbevelingen moet worden afgeweken, bijvoorbeeld door een intacte sedimentkern te gebruiken of sediment dat aan de teststof blootgesteld kan zijn, zijn daarvoor andere methoden beschikbaar (9).

1.2 DEFINITIES

In alle gevallen moeten eenheden van het Internationale Eenhedenstelsel (SI) worden gebruikt.

Teststof : een stof, hetzij de oorspronkelijke verbinding, hetzij relevante omzettingproducten.

Omzettingproducten : alle stoffen die ontstaan bij biotische en abiotische omzettingreacties van de teststof, met inbegrip van CO₂ en gebonden residuen.

Gebonden residuen : verbindingen in de bodem, in planten of in dieren die na extractie in de vorm van de oorspronkelijke verbinding of de metaboliëten daarvan in de matrix achterblijven. De extractiemethode mag de verbindingen zelf of de structuur van de matrix niet significant wijzigen. De aard van de binding kan gedeeltelijk worden opgehelderd door extractiemethoden die de matrix wijzigen of door verfijnde analysetechnieken. Tot op heden zijn op deze manier bijvoorbeeld covalente, ionische en sorptiebindingen en insluitingen gesignaleerd. In het algemeen heeft de vorming van gebonden residuen tot gevolg dat de biologische toegankelijkheid en de biologische beschikbaarheid significant afnemen (10) [gewijzigd overgenomen uit IUPAC 1984 (11)].

Aërobe omzetting (oxiderend) : reacties die in aanwezigheid van moleculaire zuurstof verlopen (12).

Anaërobe omzetting (reducerend) : reacties die bij uitsluiting van moleculaire zuurstof verlopen (12).

Natuurlijk water : oppervlaktewater dat uit bijvoorbeeld een meer of een rivier wordt verkregen.

Sediment : een mengsel van anorganische en organische chemische bestanddelen, in het laatste geval bestaande uit verbindingen met een hoog koolstof- en stikstofgehalte en een hoog molecuulgewicht. Het wordt afgezet door natuurlijk water en vormt een grensvlak met dat water.

Mineralisatie : de volledige afbraak van een organische verbinding tot CO₂ en H₂O onder aërobe omstandigheden en CH₄, CO₂ en H₂O onder anaërobe omstandigheden. In de context van deze testmethode betekent mineralisatie, wanneer radioactief gelabelde verbindingen worden gebruikt, een volledige afbraak van een molecuul waarbij een gelabeld koolstofatoom volledig wordt geoxideerd of gereduceerd en een equivalente hoeveelheid respectievelijk ¹⁴CO₂ of ¹⁴CH₄ vrijkomt.

Halveringstijd (t_{0,5}) : de tijd die nodig is om 50 % van een hoeveelheid teststof om te zetten, wanneer de omzetting kan worden beschreven door kinetiek van de eerste orde; deze is onafhankelijk van de aanvankelijke concentratie.

DT₅₀ (Disappearance Time 50) : de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 50 % daalt.

DT₇₅ (Disappearance Time 75) : de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 75 % daalt.

DT₉₀ (Disappearance Time 90) : de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 90 % daalt.

1.3 REFERENTIESTOFFEN

Voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van omzettingproducten met behulp van spectroscopische en chromatografische methoden moeten referentiestoffen worden gebruikt.

1.4 INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

Voor de meting van de omzettingssnelheid kan een al dan niet met een isotoop gelabelde teststof worden gebruikt, hoewel de voorkeur wordt gegeven aan gelabeld materiaal. Voor de bestudering van de omzettingroute en voor de bepaling van een massabalans is gelabeld materiaal nodig. Labeling met ¹⁴C wordt aanbevolen, maar ook het gebruik van andere isotopen zoals ¹³C, ¹⁵N, ³H of ³²P kan nuttig zijn. Het label moet zo veel mogelijk in het meest stabiele gedeelte van het molecuul worden aangebracht¹. De chemische en/of radiochemische zuiverheid van de teststof moet ten minste 95 % zijn.

Vóór de uitvoering van een test moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn :

- de oplosbaarheid in water (methode A.6);
- de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen;
- de dampspanning (methode A.4) en de constante van de wet van Henry;
- de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (methode A.8);
- de adsorptiecoëfficiënt (K_d, K_f of K_{oc}) (Methode C.18);
- de hydrolyse (methode C.7);
- de dissociatieconstante (pK_a) [OESO-richtsnoer 112] (13);
- de chemische structuur van de teststof en eventueel de plaats van het (de) isotoopenlabel(s).

NB : De temperatuur waarbij deze metingen zijn uitgevoerd, moet worden gerapporteerd.

Ook informatie over de toxiciteit van de teststof voor micro-organismen, over de gemakkelijke en/of intrinsieke biologische afbreekbaarheid en over de aërobe en anaërobe omzetting in de bodem kan nuttig zijn.

Er moeten analysemethoden (met inbegrip van methoden voor extractie en clean-up) beschikbaar zijn voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingsproducten daarvan in water en in sediment (zie punt 1.7.2).

1.5 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Bij deze testmethode worden een aëroob en een anaëroob aquatisch sedimentsysteem gebruikt (zie bijlage 1) dat het mogelijk maakt :

- (i) de omzettingssnelheid van de teststof in een water/sedimentsysteem te meten;
- (ii) de omzettingssnelheid van de teststof in het sediment te meten;
- (iii) de mineralisatiesnelheid van de teststof en/of de omzettingsproducten daarvan te meten (wanneer een met ^{14}C gelabelde teststof wordt gebruikt);
- (iv) de omzettingsproducten in de water- en de sedimentfase kwalitatief en kwantitatief te bepalen en een massabalans op te stellen (wanneer een gelabelde teststof wordt gebruikt);
- (v) de verdeling van de teststof en de omzettingsproducten daarvan over de twee fasen gedurende een incubatieperiode in het donker (om bijvoorbeeld algenbloei te voorkomen) bij constante temperatuur te meten. Wanneer dit met het oog op de gegevens verantwoord is, worden de halveringstijd, de DT_{50} , de DT_{75} en de DT_{90} bepaald, maar deze mogen niet veel verder dan de duur van het experiment worden geëxtrapolerd (zie punt 1.2)

Voor zowel de aërobe als de anaërobe test moeten ten minste twee sedimenten met het bijbehorende water worden gebruikt (7). Er kunnen echter gevallen zijn waarin er meer dan twee aquatische sedimenten moeten worden gebruikt, bijvoorbeeld wanneer het gaat om een chemische stof die zowel in zoet water als in het mariene milieu kan voorkomen.

1.6 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De methode kan in het algemeen worden gebruikt voor alle chemische stoffen (al dan niet gelabeld) waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid en gevoeligheid beschikbaar is. Enigszins vluchtige, niet-vluchtige, in water oplosbare en slecht in water oplosbare stoffen kunnen worden getest. De test mag niet worden gebruikt voor chemische stoffen met een grote vluchtigheid vanuit water (b.v. fumigatiemiddelen of organische oplosmiddelen) die daardoor onder de experimentele omstandigheden tijdens deze test uit het water en/of het sediment verdwijnen.

De methode is tot op heden toegepast op het onderzoek van de omzetting van chemische stoffen in zoet water en sedimenten daarvan, maar kan in beginsel ook voor estuariene/mariene systemen worden gebruikt. Zij is niet geschikt voor een simulatie van de omstandigheden in stromend water (zoals rivieren) of in open zee.

1.7 KWALITEITSCRITERIA

1.7.1 Recovery

Door onmiddellijk na de toevoeging van de teststof water- en sedimentmonsters ten minste in duplo te extraheren en te analyseren wordt een eerste indicatie verkregen van de herhaalbaarheid van de analysemethode en de uniformiteit van de procedure voor het toevoegen van de teststof. In latere fasen van de experimenten wordt de recovery bepaald aan de hand van de respectieve massabalansen (wanneer gelabeld materiaal wordt gebruikt). Voor gelabelde stoffen moet de recovery tussen 90 % en 110 % liggen (6) en voor ongelabelde stoffen tussen 70 % en 110 %.

1.7.2 Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode

De herhaalbaarheid van de analysemethode (exclusief de efficiëntie van de extractie in het begin) voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingsproducten kan worden gecontroleerd door één extract van een water- of sedimentmonster, dat lang genoeg is geïncubeerd voor de vorming van omzettingsproducten, in duplo te analyseren.

De aantoonbaarheidsgrens van de analysemethode voor de teststof en voor de omzettingsproducten mag niet hoger zijn dan $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ water of sediment (als teststof) of, indien dit lager is, 1 % van de aanvankelijk aan een testsysteem toegevoegde hoeveelheid. De bepaalbaarheidsgrens moet ook worden gespecificeerd.

1.7.3 Nauwkeurigheid van de omzettingsgegevens

Een regressieanalyse van de concentratie van de teststof als functie van de tijd levert de vereiste informatie op over de nauwkeurigheid van de omzettingcurve en maakt het mogelijk de betrouwbaarheidsgrenzen te berekenen voor de halveringstijd (bij kinetiek van de pseudo-eerste orde) of de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} .

1.8 BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.8.1 Teststelsel en apparatuur

Het onderzoek moet in glazen houders (bijvoorbeeld flessen of centrifugebuizen) worden uitgevoerd, tenzij informatie vooraf (zoals de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water of sorptiegegevens) erop wijst dat de teststof zich aan glas kan hechten; in dat geval moet wellicht worden overwogen een ander materiaal (zoals Teflon) te gebruiken. Wanneer bekend is dat de teststof zich aan glas hecht, kan dit probleem met behulp van een of meer van de volgende methoden worden beperkt :

- de massa van de aan het glas gesorbeerde teststof en omzettingsproducten bepalen;
- al het glaswerk aan het eind van de test met oplosmiddel spoelen;
- geformuleerde producten gebruiken (zie ook punt 1.9.2);
- een grotere hoeveelheid co-oplosmiddel gebruiken om de teststof aan het systeem toe te voegen; als een co-oplosmiddel wordt gebruikt, mag dit geen solvolysen van de teststof veroorzaken..

In de bijlagen 2 en 3 worden voorbeelden gegeven van karakteristieke testapparaten, namelijk respectievelijk een doorstroomsysteem en een systeem van het biometer-type (14). In referentie (15) worden andere geschikte incubatiesystemen beschreven. De experimentele apparatuur moet de uitwisseling van lucht of stikstof en het wegvangen van vluchtige producten mogelijk maken. De afmetingen van de apparatuur moeten zodanig zijn dat aan de eisen van de test wordt voldaan (zie punt 1.9.1). Ventilatie kan gebeuren door zachtjes doorborrelen of door lucht of stikstof over het wateroppervlak te leiden. In het laatste geval kan het nuttig zijn het water van boven zachtjes te roeren om de zuurstof of stikstof beter in het water te verdelen. Er mag geen CO₂-vrije lucht worden gebruikt omdat daardoor de pH van het water kan stijgen. Verstoring van het sediment is in elk geval onwenselijk en moet zo veel mogelijk worden voorkomen. Enigszins vluchtige chemische stoffen moeten in een systeem van het biometer-type bij licht roeren van het wateroppervlak worden getest. Er kunnen ook gesloten systemen met lucht of stikstof boven de vloeistof en interne flacons voor het wegvangen van vluchtige producten worden gebruikt (16). Bij de aërobe test is een periodieke verversing van het gas boven de vloeistof nodig om het zuurstofverbruik door de biomassa te compenseren.

Voor het wegvangen van vluchtige omzettingproducten kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt : kaliumhydroxide- of natriumhydroxide-oplossingen van 1 moldm⁻³ voor kooldioxide² en ethyleenglycol, ethanolamine of 2 % paraffine in xyleen voor organische verbindingen. Vluchtige stoffen die onder anaërobe omstandigheden ontstaan, zoals methaan, kunnen bijvoorbeeld met een moleculaire zeef worden opgevangen. Deze vluchtige stoffen kunnen bijvoorbeeld tot CO₂ worden verbrand door het gas bij een temperatuur van 900 °C door een met CuO gevulde kwartsbuis te leiden en het gevormde CO₂ in een alkalische absorptieoplossing weg te vangen (17).

Er is laboratoriumapparatuur voor de chemische analyse van de teststof en de omzettingproducten nodig (gaschromatografie (GLC), hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC), dunnelaagchromatografie (TLC), massaspectroscopie (MS), gaschromatografie-massaspectrometrie (GC/MS), vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC/MS), kernspinresonantie (NMR) enz.) met inbegrip van detectiesystemen voor al dan niet radioactief gelabelde chemische stoffen. Wanneer radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt, zijn ook een vloeistofscintillatieteller en een verbrandingsoxidator (voor de verbranding van sedimentmonsters vóór de analyse van de radioactiviteit) nodig.

Daarnaast zijn eventueel ook andere standaard-laboratoriumapparatuur voor fysisch-chemische en biologische bepalingen (zie tabel 1 onder punt 1.8.2.2), glaswerk, chemicaliën en reagentia nodig.

1.8.2 Selectie van aquatische sedimenten en aantal sedimenten

De monsternemingsplaatsen moeten aan de hand van het doel van de test in een bepaalde situatie worden gekozen. Bij de keuze van de monsternemingsplaatsen moet rekening worden gehouden met stoffen die wellicht in het verleden door landbouw, industrie of huishoudens in het stroomgebied en het water stroomopwaarts terecht zijn gekomen. Als het sediment in de loop van de voorgaande vier jaar met de teststof of structureel analoge verbindingen is verontreinigd, mag het niet worden gebruikt.

1.8.2.1 Selectie van het sediment

Voor het aërobe onderzoek worden normaal gesproken twee sedimenten gebruikt (7). Het organisch koolstofgehalte en de textuur van de gekozen sedimenten moeten verschillen. Eén sediment moet een hoog organisch koolstofgehalte (2,5-7,5 %) en een fijne textuur hebben en het andere sediment een laag organisch koolstofgehalte (0,5-2,5 %) en een grove textuur. Het verschil in organisch koolstofgehalte moet normaal gesproken ten minste 2 % zijn. Een "fijne textuur" wordt gedefinieerd als een gehalte aan [klei + silt]³ van > 50 % en een "grote textuur" wordt gedefinieerd als een gehalte aan [klei + silt] van < 50 %. Het verschil in gehalte aan [klei + silt] voor de twee sedimenten moet normaal gesproken ten minste 20 % zijn. Wanneer een chemische stof ook in het zeewater terecht kan komen, moet ten minste een van de water/sedimentsystemen van mariene herkomst zijn.

Voor het strikt anaërobe onderzoek moeten monsters van twee sedimenten (met het bijbehorende water) uit de anaërobe zones van oppervlaktewateren worden genomen(7). Zowel het sediment als de waterfase moeten voorzichtig worden behandeld en vervoerd zodat er geen zuurstof bij kan komen.

Ook andere parameters kunnen belangrijk zijn bij de keuze van sedimenten en moeten van geval tot geval worden bezien. Zo zal het pH-bereik van sedimenten belangrijk zijn wanneer chemische stoffen worden getest waarvan de omzetting en/of sorptie pH-afhankelijk kunnen zijn. Een pH-afhankelijkheid van sorptie kan gevolgen hebben voor de pK_a van de teststof.

1.8.2.2 Karakterisering van de water/sedimentmonsters

In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de sleutelparameters die voor zowel water als sediment moeten worden gemeten en gerapporteerd (met vermelding van de gebruikte methode) en de fase van de test waarin deze parameters moeten worden bepaald. Ter informatie : methoden voor de bepaling van deze parameters worden vermeld in de referenties (18) (19) (20) (21).

Daarnaast kan het van geval tot geval nodig zijn andere parameters te meten en te rapporteren (bijvoorbeeld voor zoet water : deeltjes, alkaliniteit, hardheid, geleidingsvermogen en NO₃/PO₄ (verhouding en elk apart); voor sedimenten : kation-uitwisselingscapaciteit, waterhoudend vermogen, carbonaat en stikstof en fosfor totaal; voor mariene systemen : zoutgehalte). Een analyse van sedimenten en water op nitraat, sulfaat, biologisch beschikbaar ijzer en wellicht andere elektronenacceptoren kan ook nuttig zijn bij de beoordeling van redox-omstandigheden, vooral wanneer het gaat om anaërobe omzetting.

Meting van parameters voor de karakterisering van water/sedimentmonsters (7) (22) (23)

Parameter	Fase van de testprocedure					
	Monsterneming	Nabewerking	Begin acclimatisering	Begin test	Gedurende test	Einde test
Water						
Herkomst/bron	x					
Temperatuur	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
O ₂ -concentratie*	x		x	x	x	x
Redoxpotentiaal*			x	x	x	x
Sediment						
Herkomst/bron	x					
Laagdiepte	x					
pH		x	x	x	x	x
Deeltjesgrootte-verdeling		x				
TOC		x	x	x		x
Microbiële biomassa**		x		x		x
Redoxpotentiaal*	Observatie (kleur/geur)		x	x	x	x

* Uit recent onderzoek is gebleken dat metingen van de zuurstofconcentratie van water en van redoxpotentialen geen mechanistische of voorspellende waarde hebben voor de groei en ontwikkeling van microbiële populaties in oppervlaktewateren (24)(25). De bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV, bij de monsterneming en aan het begin en aan het einde van de test) en van de concentratie van de micro/macronutriënten Ca, Mg en Mn (aan het begin en aan het einde van de test) in water en de meting van de totale hoeveelheid N en P in sedimenten (bij de monsterneming en aan het einde van de test) zijn wellicht betere instrumenten voor de interpretatie en evaluatie van de aërobe biotransformatiesnelheid en -route.

** De methode met de microbiële ademhalingsnelheid (26), de fumigatiemethode (27) of de telplaatmethode (bijvoorbeeld bacteriën, actinomyceten, fungi en totaal aantal kolonies) voor aëroob onderzoek en de vormingssnelheid van methaan voor anaëroob onderzoek.

1.8.3 Verzameling, behandeling en opslag

1.8.3.1 Verzameling

Voor de monsterneming van sediment moeten de ontwerp-richtsnoeren van de ISO voor de monsterneming van bodemsediment (8) worden gevolgd. Sedimentmonsters worden genomen van de hele bovenste sedimentlaag van 5 tot 10 cm. Het bijbehorende water moet op dezelfde plaats en op hetzelfde tijdstip als het sediment worden verzameld. Voor het anaërobe onderzoek moet het monster van het sediment en het bijbehorende water worden genomen en vervoerd zonder dat er zuurstof bij kan komen (28) (zie punt 1.8.2.1). In de literatuur worden enkele monsterneming-apparaten beschreven (8) (23).

1.8.3.2 Behandeling

Het sediment wordt door filtratie van het water gescheiden en het sediment wordt met behulp van extra water van de locatie, dat vervolgens wordt weggegooid, nat gezeefd over een zeef van 2 mm. Vervolgens worden bekende hoeveelheden sediment en water in de gewenste verhouding (zie punt 1.9.1) in incubatiekolven gemengd en voorbehandeld voor de acclimatiseringsperiode (zie punt 1.8.4). Voor het anaërobe onderzoek moeten alle bewerkingen worden uitgevoerd zonder dat er zuurstof bij kan komen (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3 Opslag

Het gebruik van verse monsters sediment en water wordt ten zeerste aanbevolen, maar als opslag nodig is, moeten sediment en water volgens bovenstaande beschrijving worden gezeefd en samen in een laag water (6-10 cm) in het donker bij $4 \pm 2^\circ\text{C}$ gedurende maximaal 4 weken worden opgeslagen (7) (8) (23). Monsters die voor aëroob onderzoek worden gebruikt, moeten zodanig worden bewaard dat er gemakkelijk lucht bij kan komen (bijvoorbeeld in open bakken), terwijl monsters voor anaëroob onderzoek zodanig moeten worden bewaard dat er geen zuurstof bij kan komen. Bevriezing van sediment en water en uitdroging van het sediment tijdens het vervoer en de opslag moeten worden voorkomen.

1.8.4 Voorbehandeling van de sediment/watermonsters voor de test

Voordat de teststof wordt toegevoegd, wordt elk sediment/watermonster geacclimatiseerd. Daartoe worden de monsters onder precies dezelfde omstandigheden als die van de incubatie tijdens de test in het incubatieapparaat gebracht dat bij de test zal worden gebruikt (zie punt 1.9.1). De acclimatiseringsperiode is de tijd die het systeem nodig heeft om redelijk stabiel te worden, zoals dit tot uiting komt in de pH, de zuurstofconcentratie in het water, de redoxpotentiaal van het sediment en het water en de macroscopische scheiding van de fasen. De acclimatiseringsperiode duurt normaal gesproken een tot twee weken en mag niet meer dan vier weken duren. De resultaten van de tijdens deze periode uitgevoerde bepalingen moeten worden gerapporteerd.

1.9 UITVOERING VAN DE TEST

1.9.1 Testomstandigheden

De test wordt in het incubatieapparaat (zie punt 1.8.1) uitgevoerd met een volumeverhouding water/sediment tussen 3 : 1 en 4 : 1 en een sedimentlaag van 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm)⁴. Een minimum hoeveelheid van 50 g sediment (droog gewicht) per incubatie tijdens wordt.

De test wordt in het donker bij een constante temperatuur tussen 10 °C en 30 °C uitgevoerd. Een temperatuur van $20 \pm 2^\circ\text{C}$ is geschikt. Daarnaast kan waar nodig, afhankelijk van de informatie die de test moet opleveren, van geval tot geval ook een lagere temperatuur (bijvoorbeeld 10°C) worden overwogen. De incubatietemperatuur worden gemonitord en gerapporteerd.

1.9.2 Behandeling en toevoeging van de teststof

Er wordt één concentratie van de teststof gebruikt⁵. Voor gewasbeschermingsmiddelen die rechtstreeks in wateren worden gebracht, moet de op de etikettering vermelde maximale dosering als de maximaal toe te dienen hoeveelheid worden gebruikt, berekend op basis van het oppervlak van het water in de houder. In alle andere gevallen wordt de te gebruiken concentratie afgeleid van de geraamde emissie in het milieu. Er moet voor worden gezorgd dat de concentratie van de teststof voldoende is om de omzettingroute en de vorming en afbraak van de omzettingproducten te kunnen karakteriseren. Het kan nodig zijn hogere doses te gebruiken (bijvoorbeeld een factor 10 hoger), wanneer de concentraties van de teststof aan het begin van de test dicht bij de aantoonbaarheidsgrens liggen en/of wanneer belangrijke omzettingproducten niet gemakkelijk kunnen worden aangetoond wanneer hun concentratie 10 % van de oorspronkelijk gebruikte hoeveelheid teststof bedraagt. Als er echter hogere testconcentraties worden gebruikt, mogen deze geen significante schadelijke effecten hebben op de microbiële activiteit van het water/sedimentsysteem. Om voor een constante concentratie van de teststof in houders met verschillende afmetingen te zorgen, kan het nodig zijn de hoeveelheid toe te voegen materiaal aan te passen op basis van de verhouding tussen de diepte van de waterkolom in de houder en de waterdiepte in het veld (er wordt uitgegaan van een diepte van 100 cm, maar ook een andere diepte kan worden gebruikt). Voor een voorbeeld van een dergelijke berekening wordt verwezen naar bijlage 4.

In het ideale geval wordt de teststof als waterige oplossing aan de waterfase van het testsysteem toegevoegd. Als dit onvermijdelijk is, mogen kleine hoeveelheden met water mengbare oplosmiddelen (zoals aceton of ethanol) voor de toevoeging en verdeling van de teststof worden gebruikt, maar deze hoeveelheden mogen niet groter zijn dan 1 % (v/v) en geen schadelijke effecten op de microbiële activiteit van het testsysteem hebben. De bereiding van de waterige oplossing van de teststof moet voorzichtig gebeuren – het gebruik van een generatorkolom of menging vooraf kan nodig zijn om voor een volledige homogeniteit te zorgen. Na de toevoeging van de waterige oplossing aan het testsysteem wordt aanbevolen de waterfase voorzichtig te mengen, waarbij het sediment zo min mogelijk wordt verstoord.

Het gebruik van geformuleerde producten wordt normaal gesproken afgeraden, aangezien de bestanddelen van de formulering de verdeling van de teststof en/of de omzettingproducten over de water- en sedimentfase kunnen beïnvloeden. Voor slecht in water oplosbare stoffen kan het gebruik van geformuleerd materiaal echter een geschikt alternatief zijn.

Het aantal incubatiehouders is afhankelijk van het aantal monsternemingstijdstippen (zie punt 1.9.3). Er moeten zo veel testsystemen beschikbaar zijn dat er op elk monsternemingstijdstip twee systemen uit de proef kunnen worden genomen. Wanneer er controle-opstellingen voor elk aquatisch sedimentsysteem worden gebruikt, mogen deze niet met de teststof worden behandeld. De controle-opstellingen kunnen worden gebruikt om aan het eind van het onderzoek de microbiële biomassa van het sediment en de totale hoeveelheid organische koolstof in het water en het sediment te bepalen. Twee controle-opstellingen (d.w.z. één voor elk aquatisch sediment) kunnen worden gebruikt voor de monitoring van de vereiste parameters in het sediment en het water gedurende de acclimatiseringsperiode (zie de tabel onder punt 1.8.2.2). Wanneer de teststof met behulp van een oplosmiddel wordt toegevoegd, zijn twee extra controle-opstellingen nodig om de schadelijke effecten daarvan op de microbiële activiteit van het testsysteem te meten.

1.9.3 Duur van de test en monsterneming

Het experiment mag normaal gesproken niet langer duren dan 100 dagen (6) en moet worden voortgezet totdat de afbraakroute en het verdelingspatroon sediment/water vaststaan of 90 % van de teststof door omzetting en/of vervluchtiging is verdwenen. Er moeten ten minste zes monsternemingstijdstippen zijn (inclusief het beginpunt) en een facultatief vooronderzoek (zie punt 1.9.4) kan worden gebruikt om een adequaat monsternemingsschema vast te stellen en de duur van de test te bepalen, tenzij er uit eerder onderzoek voldoende gegevens over de teststof beschikbaar zijn. Voor hydrofobe teststoffen kunnen extra monsternemingspunten tijdens de beginfase van het onderzoek nodig zijn om de snelheid van de verdeling over de sediment- en de waterfase te bepalen.

Op geschikte monsternemingstijdstippen worden hele incubatiehouders (in duplo) voor analyse uit de test genomen. Het sediment en het bovenstaande water worden apart geanalyseerd⁶. Het bovenstaande water wordt voorzichtig verwijderd, waarbij het sediment zo min mogelijk wordt verstoord. Bij de extractie en karakterisering van de teststof en de omzettingproducten worden adequate analyseprocedures gevolgd. Er moet op worden gelet dat ook materiaal dat aan de incubatiehouder of aan de verbindingen buizen voor het wegvangen van vluchtige stoffen is geabsorbeerd, wordt verwijderd.

1.9.4 Facultatief vooronderzoek

Als de duur en het monsternemingsschema niet aan de hand van ander relevant onderzoek aan de teststof kunnen worden bepaald, kan een facultatief vooronderzoek nuttig zijn, dat onder dezelfde testomstandigheden wordt uitgevoerd als het definitieve onderzoek. Als er een vooronderzoek wordt uitgevoerd, moeten de relevante experimentele omstandigheden en resultaten daarvan kort worden gerapporteerd.

1.9.5 Metingen en analyse

Voor elk monsternemingstijdstip wordt de concentratie van de teststof en de omzettingproducten in het water en het sediment gemeten en gerapporteerd (als concentratie en als percentage van de toegevoegde hoeveelheid). In het algemeen moeten omzettingproducten die op enig monsternemingstijdstip in grotere hoeveelheden dan 10 % van de toegevoegde radioactiviteit in het hele water/sedimentsysteem worden bepaald, worden geïdentificeerd tenzij er een redelijke motivering is om dit niet te doen. Ook voor omzettingproducten waarvan de concentratie gedurende het onderzoek voortdurend stijgt, moet identificatie worden overwogen, zelfs als hun concentratie niet hoger wordt dan bovengenoemde grenswaarde, aangezien dit op persistentie kan wijzen. Deze aspecten moeten van geval tot geval worden bekeken en in het verslag moet een motivering van de conclusies worden opgenomen.

Voor elk monsternemingstijdstip worden ook de resultaten van systemen voor het wegvangen van gassen en vluchtige stoffen (CO₂ en bijvoorbeeld vluchtige organische verbindingen) gerapporteerd. Ook de mineralisatiesnelheden worden gerapporteerd. Voor elk monsternemingstijdstip worden de niet-extraheerbare (gebonden) residuen in sediment gerapporteerd.

2 GEDEVENS

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Voor elk monsternemingstijdstip wordt de totale massabalans of de recovery (zie punt 1.7.1) van de toegevoegde radioactiviteit berekend. De resultaten worden als percentage van de toegevoegde radioactiviteit gerapporteerd. De verdeling van de radioactiviteit tussen water en sediment wordt voor elk monsternemingstijdstip als concentratie en als percentage gerapporteerd.

De halveringstijd, de DT₅₀ en eventueel de DT₇₅ en de DT₉₀ van de teststof worden samen met hun betrouwbaarheidsgrenzen (zie punt 1.7.3) berekend. Informatie over de snelheid waarmee de teststof uit het water en het sediment verdwijnt, kan met behulp van geschikte evaluatiehulpmiddelen worden verkregen. Deze kunnen variëren van het gebruik van kinetiek van de pseudo-eerste orde en empirische technieken voor de bepaling van de optimale curve waarbij grafische of numerieke oplossingen worden toegepast, tot complexere evaluaties met behulp van bijvoorbeeld modellen met een of meer compartimenten. Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar de desbetreffende gepubliceerde literatuur (35) (36) (37).

Alle benaderingen hebben hun sterke en zwakke punten en lopen qua complexiteit sterk uiteen. Wanneer wordt uitgegaan van kinetiek van de eerste orde, worden de afbraak- en distributieprocessen wellicht te zeer vereenvoudigd, maar wanneer dit mogelijk is levert dit een parameter op (de snelheidsconstante of halveringstijd) die gemakkelijk te begrijpen is en bruikbaar is voor simulatiemodellen en de berekening van geraamde milieuconcentraties. Empirische benaderingen of lineaire transformaties kunnen leiden tot curves die beter bij de gegevens aansluiten en maken derhalve een betere bepaling van de halveringstijd, de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} mogelijk. Het nut van de afgeleide constanten is echter beperkt. Compartimentmodellen kunnen een aantal nuttige constanten voor een risicobeoordeling opleveren, die de afbraaksnelheid in verschillende compartimenten en de verdeling van de chemische stof beschrijven. Ze moeten ook worden gebruikt voor de bepaling van de snelheidsconstanten voor de vorming en afbraak van belangrijke omzettingen. In alle gevallen moet er een motivering voor de keuze van de methode worden gegeven en moet degene die het experiment uitvoert grafisch en/of statistisch aantonen hoe goed de curve en de gegevens bij elkaar aansluiten.

3 RAPPORTAGE

3.1 TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

De teststof :

- de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule (waarin de plaats van het label of de labels wordt aangegeven als radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt) en relevante fysisch-chemische eigenschappen;
- de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;
- de radiochemische zuiverheid van een gelabelde stof en de molaire activiteit (indien van toepassing).

Referentiestoffen :

- de chemische naam en de structuur van referentiestoffen die voor de karakterisering en/of de identificatie van omzettingen worden gebruikt.

Voor de test gebruikte sedimenten en wateren :

- de locatie en een beschrijving van de monsternemingsplaats(en) voor het aquatische sediment met indien mogelijk een vermelding van de verontreiniging in het verleden;
- alle informatie over de verzameling, de opslag (als ze zijn opgeslagen) en de acclimatisering van water/sedimentsystemen;
- de kenmerken van de sediment/watermonsters, zoals vermeld in de tabel onder punt 1.8.2.2.

De testomstandigheden :

- het gebruikte testsysteem (bijvoorbeeld doorstroomsysteem, biometer-type, wijze van ventilatie, roermethode, watervolume, sedimentmassa, dikte van de water- en de sedimentlaag, afmetingen van de testhouders enz.);
- de toevoeging van de teststof aan het systeem : gebruikte concentratie bij de test, aantal replicaatbepalingen en controlebepalingen en de wijze waarop de teststof is toegevoegd (bijvoorbeeld een eventueel gebruik van een oplosmiddel) enz.;
- de incubatietemperatuur;
- de monsternemingstijdstippen;
- de extractiemethoden met de efficiëntie en de analysemethoden met de aantoonbaarheidsgrens
- de methoden voor de karakterisering/identificatie van de omzettingen;
- afwijkingen van het testprotocol of de testomstandigheden tijdens het onderzoek.

De resultaten :

- onbewerkte gegevens van representatieve analyses (alle onbewerkte gegevens moeten in het GLP-archief worden bewaard);
- de herhaalbaarheid en gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden;
- de recovery (onder punt 1.7.1 wordt vermeld welke percentages voor een geldig onderzoek gehaald moeten worden);
- tabellen met de resultaten, uitgedrukt als percentage van de gebruikte dosis en in $mg \times kg^{-1}$ in het water, het sediment en het totale systeem (alleen percentage), voor de teststof en eventueel de omzettingen en de niet-extraheerbare radioactiviteit;
- de massabalans gedurende en aan het eind van het onderzoek;
- een grafische voorstelling van de omzetting in het water, in het sediment en in het totale systeem (met inbegrip van de mineralisatie);
- de mineralisatiesnelheid;
- de halveringstijd, de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingen, met vermelding van de betrouwbaarheidsgrenzen, in het water, in het sediment en in het totale systeem;
- een evaluatie van de omzettingen van de teststof en eventueel de belangrijke omzettingen;
- de voorgestelde omzettingroute, indien van toepassing;
- een bespreking van de resultaten.

4 REFERENTIES

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1 : Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides : Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.
- (4) Agriculture Canada : Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.
- (5) US-EPA : Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry : Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality - Sampling - Part 12 : Guidance on sampling of bottom sediments.

- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG : Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts : Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A : Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993) : Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000) : Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.
- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.
- (18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop « A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests », 3-4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds. : I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters : multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol., 329-338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.
- (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2 : Fumigation-extraction method.
- (28) Beelen, P. van and F. van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.
- (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemosphere 27, 1499-1509.
- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, 39, 187 - 203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, 33, 47 - 60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, pp 1349-1354

Nota's

- (1) Als de teststof bijvoorbeeld één ring bevat, moet deze ring worden gelabeld; als de teststof twee of meer ringen bevat, kan er apart onderzoek nodig zijn om te bekijken wat er met elke gelabelde ring gebeurt en om bruikbare informatie over de vorming van omzettingsproducten te verkrijgen.
- (2) Aangezien deze alkalische absorptie-oplossingen ook kooldioxide uit de ventilatielucht absorberen en kooldioxide die bij aërobe experimenten door ademhaling ontstaat, moeten ze geregeld worden ververst om verzadiging en zodoende verlies van hun absorptievermogen te voorkomen.
- (3) [Klei + silt] is de minerale fractie van het sediment met een deeltjesgrootte <50 µm.
- (4) Uit recent onderzoek is gebleken dat opslag bij 4°C tot een afname van het organisch koolstofgehalte van het sediment kan leiden, hetgeen mogelijkwijs tot gevolg kan hebben dat de microbiële activiteit afneemt (34).
- (5) Een test met een tweede concentratie kan nuttig zijn voor chemische stoffen die langs verschillende routes in het oppervlaktewater terechtkomen en waarbij dit tot significant verschillende concentraties leidt, zolang de laagste concentratie met een afdoende nauwkeurigheid kan worden geanalyseerd.
- (6) Wanneer een snelle heroxidatie van anaërobe omzettingsproducten aannemelijk is, moeten ook bij de monsterneming en analyse anaërobe omstandigheden worden gehandhaafd.

Bijlage 1

RICHTSNOEREN VOOR HET AËROBE EN HET ANAËROBE TESTSYSTEEM

Het aërobe testsysteem

Het in deze testmethode beschreven aërobe testsysteem bestaat uit een aërobe waterlaag (met een zuurstofconcentratie die normaal tussen 7 en 10 mg l⁻¹ ligt) en een sedimentlaag die aan het oppervlak aëroob en onder het oppervlak anaëroob is (met een gemiddelde redoxpotentiaal (E_h) in het anaërobe gedeelte van het sediment die normaal tussen -80 en -190 mV ligt). In elke incubatie-opstelling wordt vochtige lucht over het wateroppervlak geleid om voor voldoende zuurstof in de ruimte boven het water te zorgen.

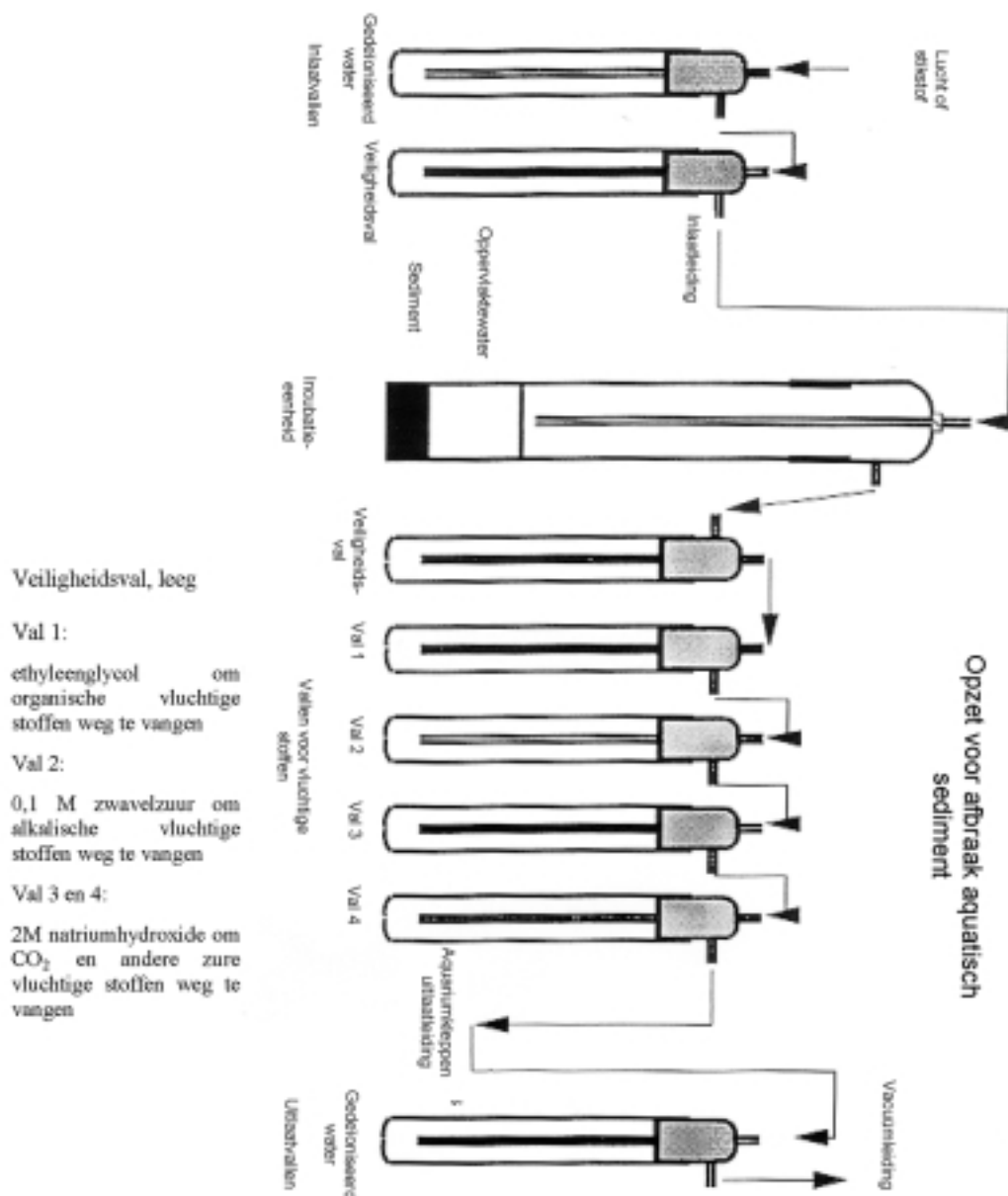
Het anaërobe testsysteem

Voor het anaërobe testsysteem is de testprocedure in grote lijnen gelijk aan de voor het aërobe systeem geschetste procedure, behalve dat in elke incubatie-opstelling vochtige stikstof over het wateroppervlak wordt geleid om voor voldoende stikstof in de ruimte boven het water te zorgen. Het sediment en het water worden als anaëroob beschouwd zodra de redoxpotentiaal (E_h) lager dan -100 mV is.

Bij de anaërobe test wordt voor de bepaling van de mineralisatie ook het vrijgekomen kooldioxide en methaan gemeten.

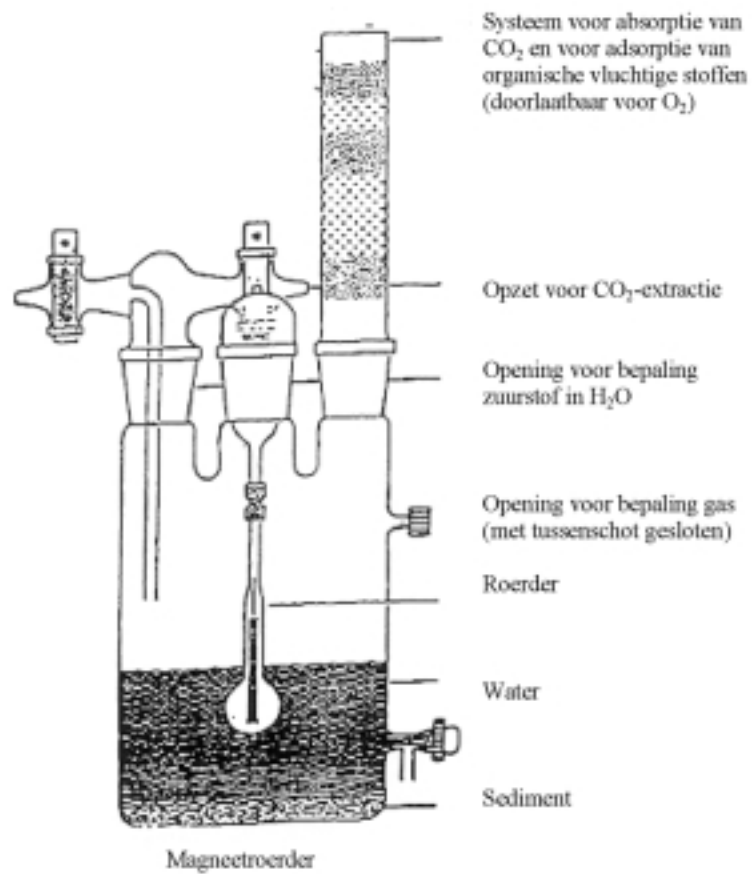
BIJLAGE 2

VOORBEELD VAN EEN DOORSTROOMOPSTELLING



BIJLAGE 3

VOORBEELD VAN EEN BIOMETER-APPARAAT



BIJLAGE 4

VOORBEELD VOOR DE BEREKENING VAN DE HOEVEELHEID TESTSTOF DIE AAN EEN TESTHOUDER
WORDT TOEGEVOEGD

Inwendige diameter van de cylinder:	= 8 cm
Diepte waterkolom zonder sediment:	= 12 cm
Oppervlak waterspiegel: $3,142 \times 4^2$	= $50,3 \text{ cm}^2$
Toe te voegen hoeveelheid: 500 g teststof/ha komt overeen met $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	
Totaal in μg : $5 \times 50,3$	= $251,5 \mu\text{g}$
Aanpassing van de hoeveelheid op basis van een diepte van 100 cm:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= $30,18 \mu\text{g}$
Volume van de waterkolom: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Concentratie in water: $30,18 \div 603$	= $0,050 \mu\text{g}/\text{ml}$ of $50 \mu\text{g}/\text{l}$ »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 17 maart 2005.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,
R. DEMOTTE

De Minister van Leefmilieu,
B. TOBBACK