

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

**Bijlage II B**

---

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

**1. METHODE**

1.1. Inleiding

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

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

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

Zie ook de algemene inleiding deel B.

## 1.2. Definities

Zie algemene inleiding deel B.

## 1.3. Principe van de testmethode

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

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

## 1.4. Beschrijving van de testmethode

### 1.4.1. Voorbereiding

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

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

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

Voor het toedienen van de dosis dienen de proefdieren te vasten. Aan ratten wordt gedurende de voorafgaande nacht geen voedsel verstrekt, voor muizen geldt een

periode van 3-4 uur. Water mag onbeperkt worden gegeven.

#### 1.4.2. Proefomstandigheden

##### 1.4.2.1. Proefdieren

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

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

##### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

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

##### 1.4.2.3. Dosisniveaus

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

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

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

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

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

#### 1.4.2.4. Limiettest

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

#### 1.4.2.5. Observatieperiode

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

#### 1.4.3. Procedure

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

Het maximale vloeistofvolume dat per keer kan worden toegediend hangt af van de grootte van de proefdieren. Bij knaagdieren mag het volume doorgaans niet meer dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht bedragen; in het geval van waterige oplossingen kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht aanvaardbaar zijn. Variaties in het testvolume moeten geminimaliseerd worden door het aanpassen van de concentratie zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante volume kan worden

gebruikt. Als een enkelvoudige dosis niet mogelijk is, kan de dosis gedurende een periode van minder dan 24 uur in kleinere gedeelten worden toegediend.

Bijzonderheden van de testprocedure worden beschreven in bijlage 1.

#### 1.4.3.1. Algemene observaties

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

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

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

#### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht

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

#### 1.4.3.3. Macroscopische necropsie

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

kan opleveren.

## **2. GEGEVENS**

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

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

## **3. RAPPORTAGE**

Verslag van de proefnemingen

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

Proefdieren :

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

Proefomstandigheden :

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

Resultaten :

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

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### **4. LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 423 van de OESO.

#### **BIJLAGE 1**

#### **TESTPROCEDURE**

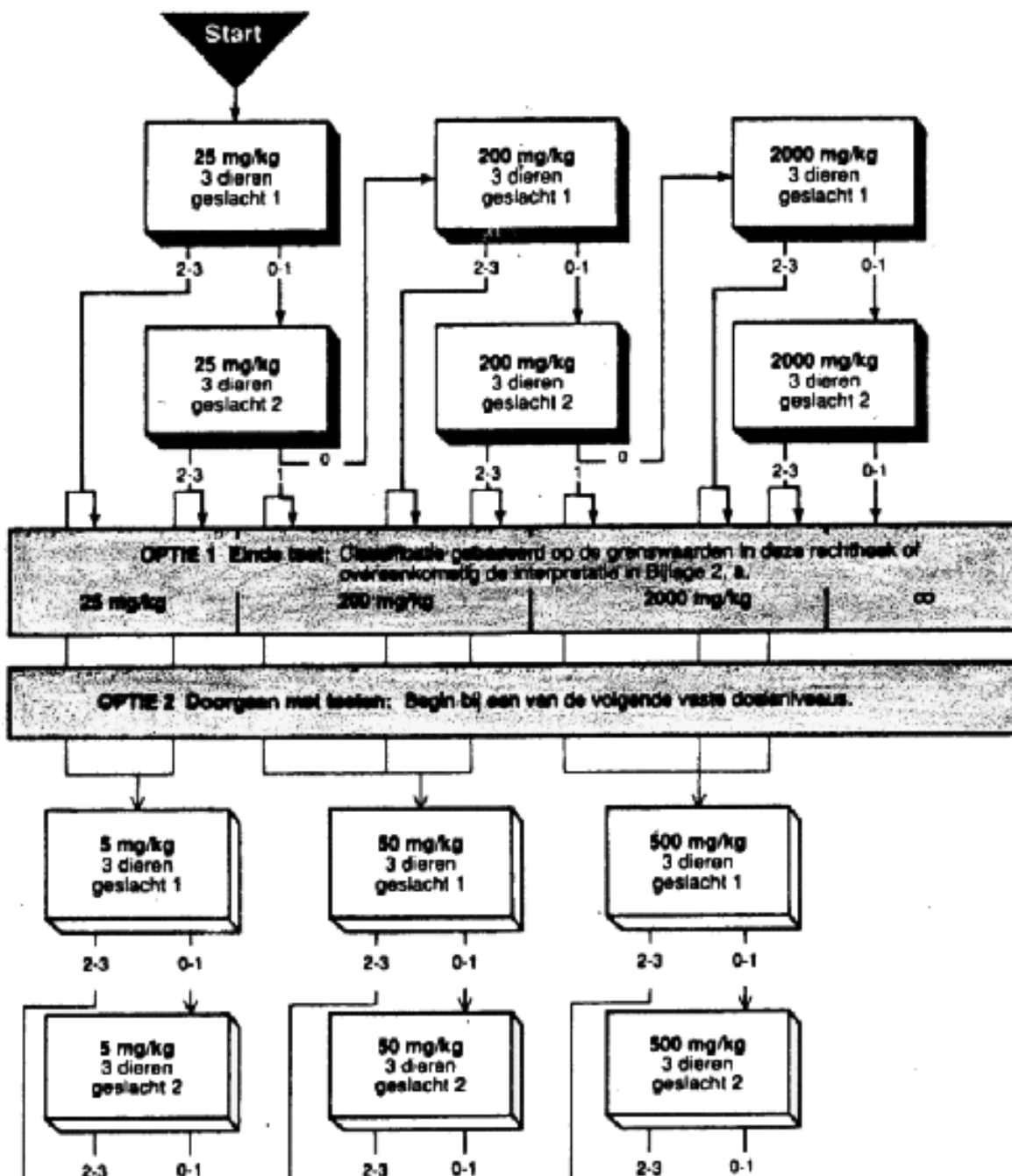
1. Zoals vermeld in punt 1.4.2.3 moet de begin dosis zó worden gekozen dat ten minste een gedeelte van de proefdieren sterft. De ter zake relevante informatie omvat onder meer :
  - gegevens over fysisch-chemische eigenschappen;
  - relaties tussen structuur en activiteit;
  - alle gegevens van andere toxiciteitstesten, en
  - het verwachte gebruik van de teststof.
2. Voor iedere begin dosis geeft het bijbehorende testschema dat in deze bijlage is opgenomen, de te volgen procedure. Afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze afgemaakte dieren volgt de testprocedure de aangegeven pijlen.
3. Indien bij een begin dosis van 25 of 200 mg/kg lichaamsgewicht slechts één dier van het tweede geslacht sterft, leidt dit gewoonlijk tot niet verder testen. Als er echter geen toxische verschijnselen worden waargenomen bij de andere vijf dieren moet bij de autopsie aan de mogelijkheid gedacht worden dat de mortaliteit geen gevolg is van de teststof. In dat geval moet de test worden vervolgd met de eerstvolgende hogere dosis.
4. Indien bij een begin dosis van 2000 mg/kg lichaamsgewicht slechts één dier per geslacht sterft is de verwachtingswaarde van de LD<sub>50</sub> meer dan 2000 mg/kg lichaamsgewicht. Omdat dit echter een grensgeval is moet de respons van de andere twee dieren per geslacht nauwkeurig worden onderzocht. Het



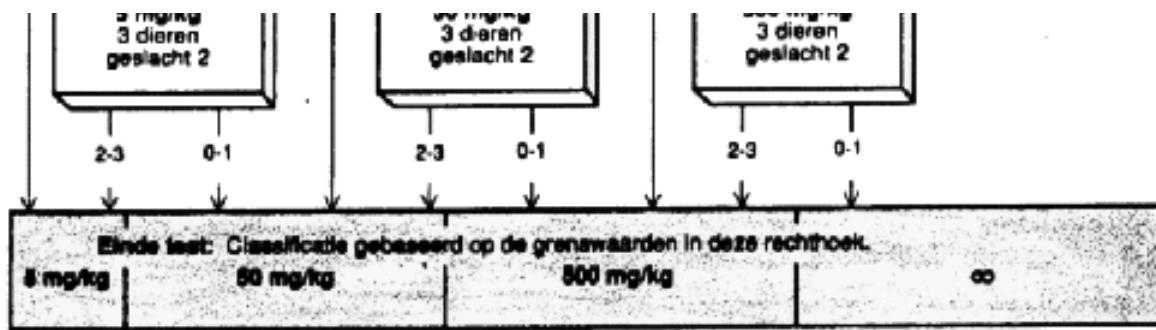
optreden van duidelijke toxische verschijnselen bij deze dieren kan aanleiding zijn tot een classificatie die overeenkomt met een LD<sub>50</sub>-waarde van 2000 mg/kg lichaamsgewicht of minder, of tot verder testen op hetzelfde niveau.

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

a) Testprocedure voor een begindosis van 25 mg/kg lichaamsgewicht.

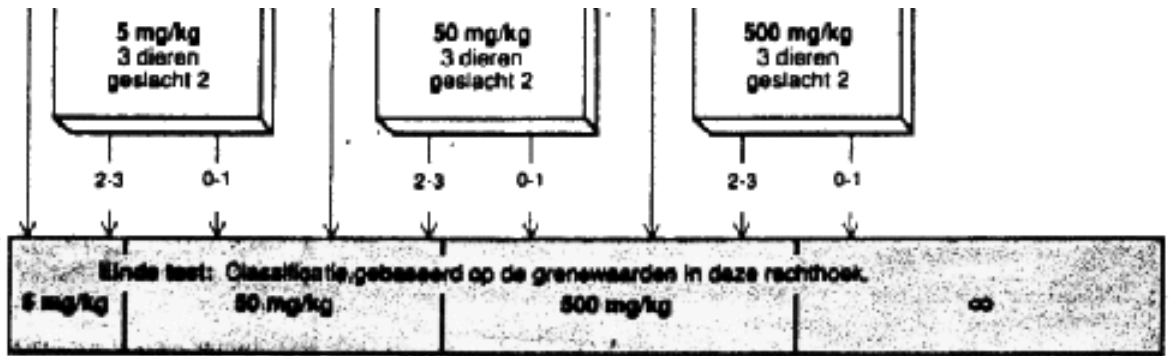






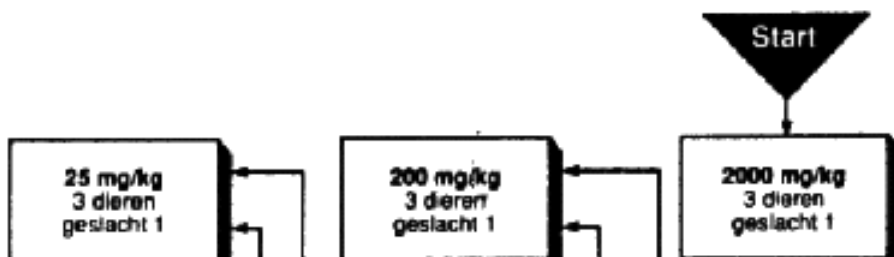
b) Testprocedure voor een beginndosis van 200 mg/kg lichaamsgewicht.

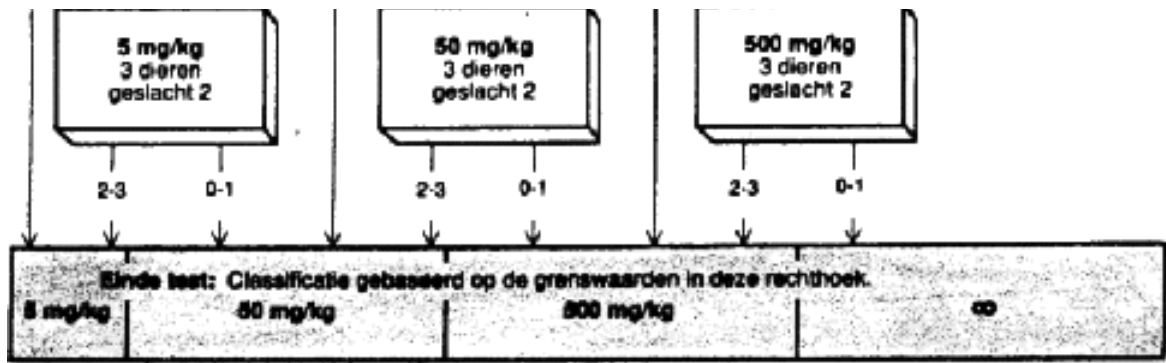




Legende:  
0,1,2,3: Aantal stervende of dode dieren van elk geslacht.

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



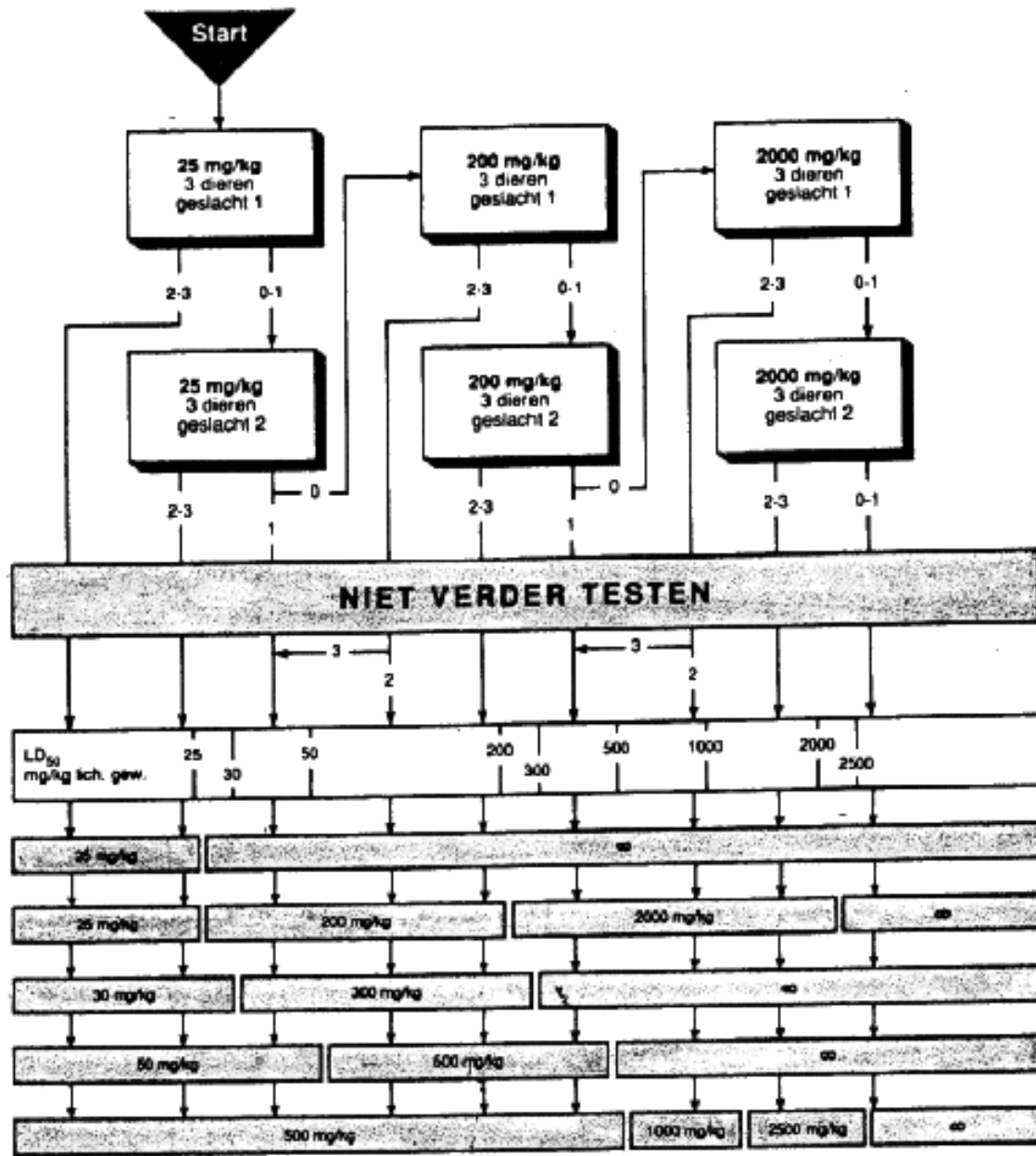


Legende:  
0,1,2,3: Aantal stervende of dode dieren van elk geslacht

## BIJLAGE 2

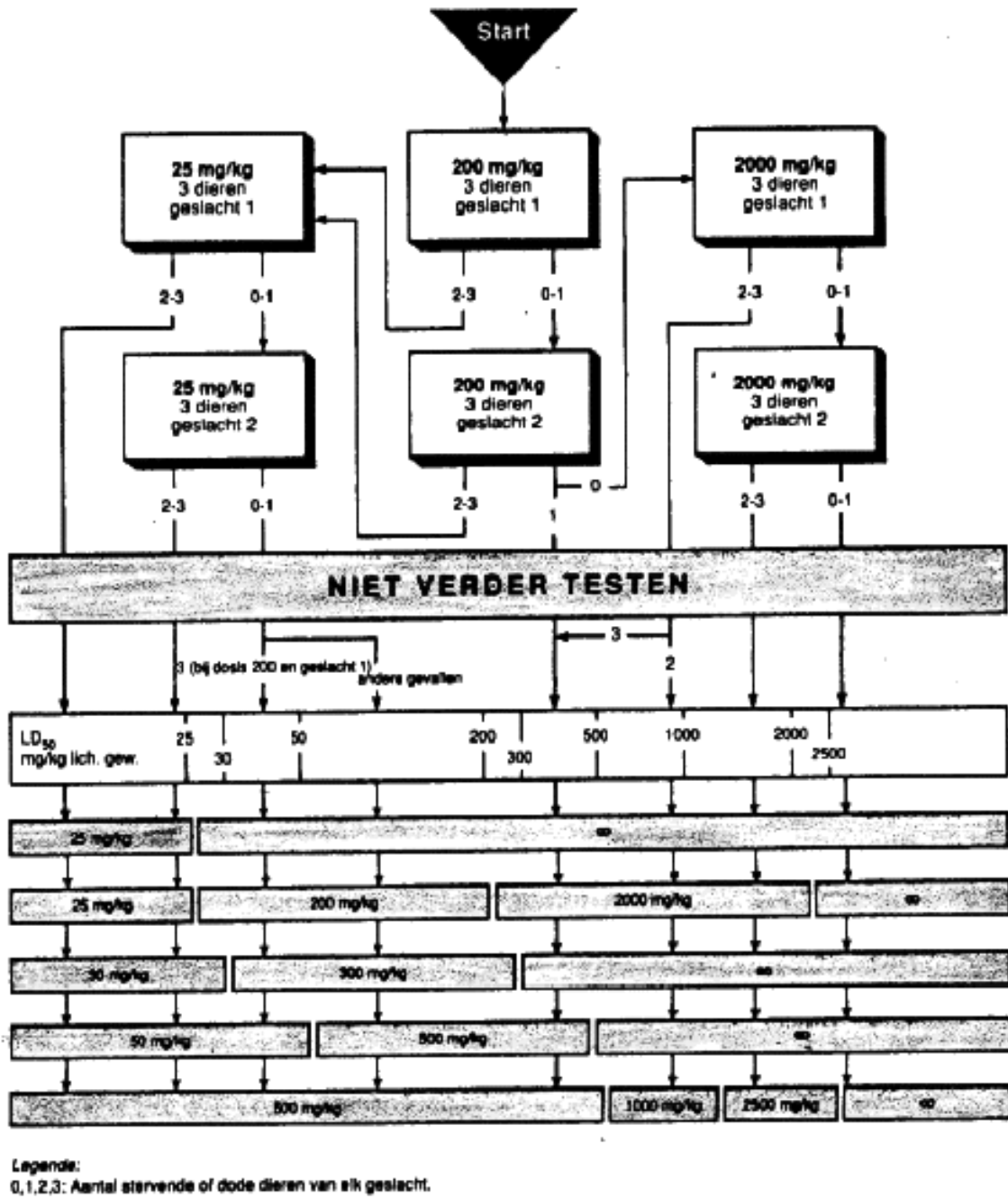
### INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN BIJ HET TESTEN VOLGENS OPTIE 1

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

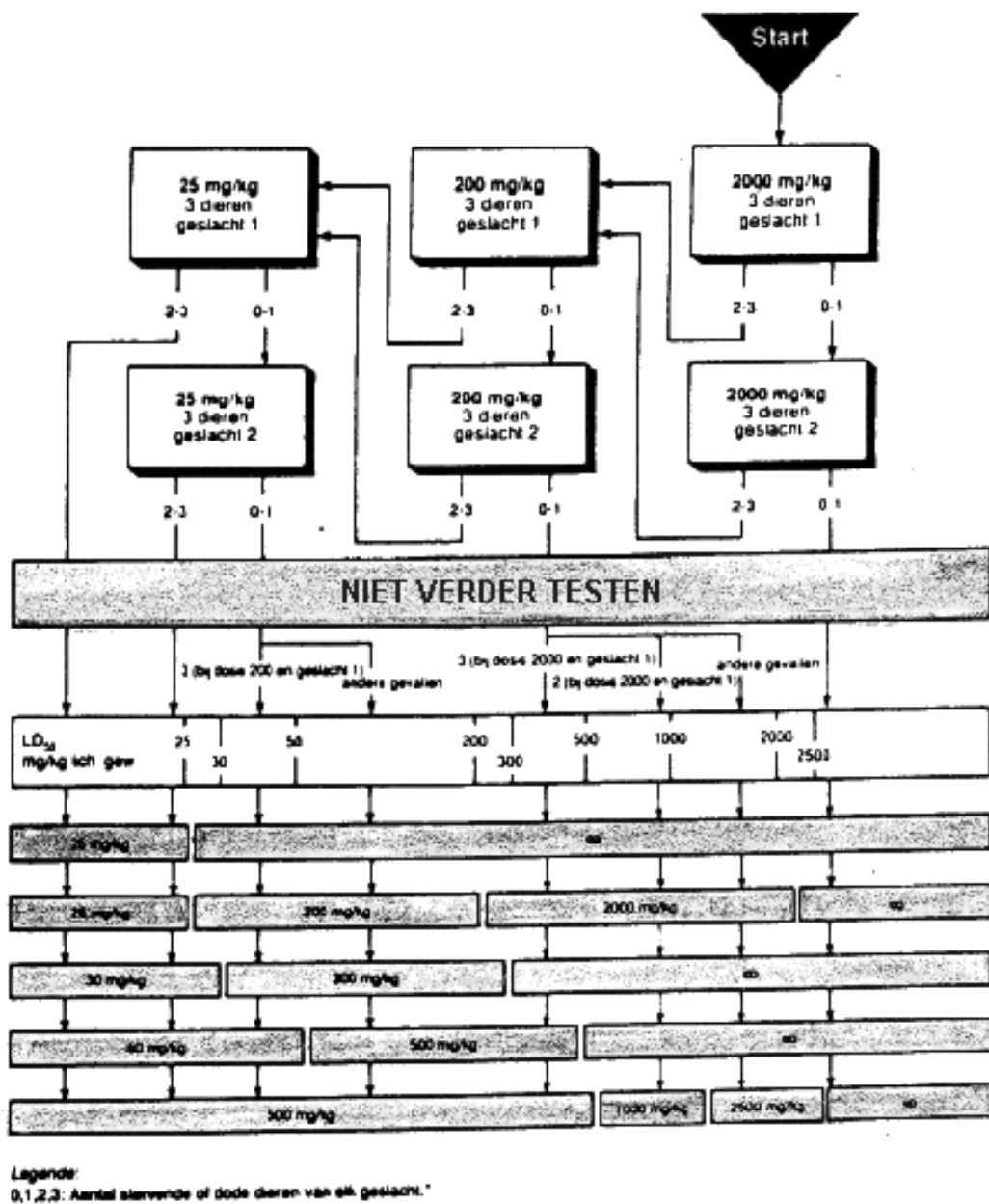


Legende:  
0,1,2,3: Aantal stervende of dode dieren van elk geslacht.

b) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1.  
 Begindosis : 200 mg/kg lichaamsgewicht



- c) Interpretatie van de resultaten bij het testen volgens optie 1.  
 Begindosis : 2000 mg/kg lichaamsgewicht



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

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,



Mevr. M. SMET

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

---

Voor vragen en/of opmerkingen over EMIS kunt u mailen naar [emis@vito.be](mailto:emis@vito.be)

Copyright © [VITO](#) 18/01/1999

Ontwerp [EMIS](#).