

**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 C**

---

"B.6 SENSIBILISATIE VAN DE HUID

**1. METHODE**

1.1. Inleiding

Opmerkingen :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zie ook algemene inleiding deel B.

## 1.2. Definities

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

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

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

**Provocatieblootstelling :** een experimentele blootstelling - na de inductieperiode - van een voorheen reeds blootgesteld proefdier aan een teststof, om vast te stellen

of het dier een hypersensitieve reactie vertoont.

### 1.3. Referentiestoffen

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

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

De volgende stoffen genieten de voorkeur :

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

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

### 1.4. Principe van de testmethode

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

### 1.5. Beschrijving van de testmethoden

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

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

##### 1.5.1.1. Voorbereiding

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

#### 1.5.1.2. Proefomstandigheden

##### 1.5.1.2.1. Proefdieren

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

##### 1.5.1.2.2. Aantal en geslacht

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

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

##### 1.5.1.2.3. Dosisniveaus

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

#### 1.5.1.3. Procedure

##### 1.5.1.3.1. Inductie

###### Dag 0 - Testgroep

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

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

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

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

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

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

#### Dag 0 - Controlegroep

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

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

Injectie 2 : het onverdunde vehiculum;

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

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

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

#### Dag 6-8 - Testgroep

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

#### Dag 6-8 - Controlegroep

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

#### 1.5.1.3.2. Provocatie

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

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

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

- Ongeveer 21 uur nadat het gaasje is verwijderd, wordt het provocatiegebied gereinigd en zo nodig zorgvuldig geknipt en/of geschoren en onthaard.
- Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 48 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.
- Ongeveer 24 uur na deze waarneming wordt een tweede waarneming gedaan (72 uur na aanvang provocatie) en eveneens geregistreerd.

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

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

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

#### 1.5.2. Buehlertest

##### 1.5.2.1. Voorbereiding

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

##### 1.5.2.2. Proefomstandigheden

###### 1.5.2.2.1. Proefdieren

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

###### 1.5.2.2.2. Aantal en geslacht

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

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

### 1.5.2.2.3. Dosisniveaus

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

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

### 1.5.2.3. Procedure

#### 1.5.2.3.1. Inductie

##### Dag 0 - Testgroep

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

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

##### Dag 0 - Controlegroep

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

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

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

#### 1.5.2.3.2. Provocatie

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

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

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

#### 1.5.2.3.3. Observatie en scoring

- Ongeveer 21 uur nadat de pleister is verwijderd wordt het provocatiegebied onthaard.
- Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 30 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.
- Ongeveer 24 uur na de 30-uurswaarneming wordt een tweede waarneming van de huidreacties gedaan (ongeveer 54 uur na aanvang van de provocatie) en worden de resultaten weer geregistreerd.

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

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

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

## 2. GEGEVENS (GPMT EN BUEHLERTEST)

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

## 3. RAPPORTAGE (GPMT EN BUEHLERTEST)

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

Verslag van de proefnemingen (GPMT en Buehlertest)

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

Proefdieren :

- gebruikte caviastam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;



- herkomst, behuizing, dieet, enz.;
- gewicht van ieder dier bij het begin van de proefneming.

Proefomstandigheden :

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

Resultaten :

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

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### 4. LITERATUUR

Deze methode komt overeen met TG 406 van de OESO

Aanhangsel

TABEL :

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

0 = geen zichtbare verandering

1 = discontinu of vlekkelig erytheem

2 = matig en aaneengesloten erytheem

3 = ernstig erytheem met zwelling"

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

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

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

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

---

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

Copyright © [VITO](http://www.vito.be) 18/01/1999

Ontwerp [EMIS](http://www.emis.vito.be).