



COMITÉ SCIENTIFIQUE DE L'AGENCE FÉDÉRALE POUR LA SÉCURITÉ DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE

AVIS 22-2007

Objet : Présence de vert malachite et de vert leucomalachite dans le poisson d'élevage (dossier Sci Com 2007/31).

Le Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire,

Vu la loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Vu l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Considérant le règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire, validé par le Ministre le 27 mars 2006;

Vu la demande d'avis de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire concernant la présence de vert malachite et de vert leucomalachite dans le poisson d'élevage;

Considérant les discussions menées lors de la réunion du groupe de travail de 24 août 2006 et de la séance plénière du 14 septembre 2007;

émet l'avis suivant :

TERMES DE REFERENCE

Dans la Décision 2002/657/CE¹ de la Commission figurent des limites de performances minimales requises ('minimum required performance limit', MRPL) pour des méthodes d'analyse visant à détecter des substances pour lesquelles une tolérance zéro est d'application. Pour la somme du vert malachite (VM, CAS No. 569-64-2) et du vert leucomalachite (VLM, CAS No. 129-73-7) dans des produits d'aquaculture, la MRPL est fixée à 2 µg/kg. Sur base de la Décision 2005/34/CE² de la Commission, ces MRPL sont utilisées comme limite d'action afin d'empêcher que

¹ Décision 2002/657/CE de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. Journal Officiel n° L 221 du 17 août 2002

² Décision 2005/34/CE de la Commission du 11 janvier 2005 établissant des normes harmonisées pour les tests de détection de certains résidus dans les produits d'origine animale importés des pays tiers. Journal Officiel n° L 16 du 20 janvier 2005

des produits à teneur plus élevée ne soient mis dans le commerce. De plus, même si la concentration en résidus est inférieure à 2 µg/kg, l'utilisation de VM est considérée comme illégale et une enquête doit être réalisée et des mesures adéquates prises à l'encontre de l'opérateur en question.

Récemment, on a détecté la présence de VM et de VLM dans des truites d'élevage (truites fario et arc-en-ciel) en des concentrations supérieures à la MRPL. Le VM est un produit anti-protazoaires et antimycotique qui était naguère largement utilisé en aquaculture, mais dont l'utilisation est à présent interdite. Devant l'impossibilité de démontrer immédiatement un usage illégal dans les établissements en question, on a émis l'hypothèse d'une pollution environnementale (Note du CER, Marloie, 20.06.2007).

Dans les établissements d'aquaculture concernés, le poisson est élevé dans des viviers en terre situés près d'une rivière. En amont des établissements, on n'a pas détecté de VM ni de VLM dans la rivière. Il n'y a pas d'indications d'une contamination industrielle.

Les résidus de VM détectés sont quasi exclusivement présents sous forme de VLM. Les concentrations en VM détectées sont essentiellement inférieures à 0,1 ppb, avec un maximum de 0,2 ppb. Les concentrations en VLM, en revanche, sont plus élevées, à savoir de l'ordre de quelques dizaines de ppb. Chez un des aquaculteurs concernés, on a également prélevé des échantillons du fond de différents étangs. Les analyses du sol (terre du fond + cailloux, la berge, terre + cailloux du fond en aval) ont donné des concentrations comprises entre 1 et 13 ppb pour le VM et entre 0 et 18 ppb pour le VLM.

Les questions suivantes sont posées au Comité scientifique :

1. La présence de résidus de VM et de VLM dans le poisson d'élevage peut-elle être provoquée par une contamination environnementale ?
2. Dans l'affirmative, est-il possible de formuler des recommandations concernant :
 - a) des critères qui permettraient aux agents de l'AFSCA de différencier la présence de résidus dans le poisson due à un traitement des animaux, par rapport à une contamination environnementale;
 - b) les conditions pouvant entraîner une contamination environnementale du site (par ex. le temps écoulé entre l'utilisation du produit et la contamination du site, le type de production, le type de site : terre/béton, quantité et type de sédiments, etc.);
 - c) les mesures que peuvent prendre les établissements d'aquaculture pour éliminer / réduire cette contamination environnementale afin que l'on ne retrouve plus de résidus dans le poisson ou que la concentration des résidus soit inférieure à la MRPL.
3. Existe-t-il à ce jour des éléments permettant de déceler l'existence d'une toxicité plus faible des résidus de VM et de VLM en cas de contamination environnementale ? Dans l'affirmative, faudrait-il fixer une MRPL / limite d'action différente dans le cas d'une contamination environnementale, et laquelle ?

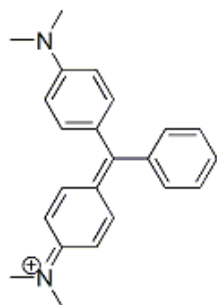
La motivation de la demande d'avis est la suivante :

Dans le cas où on constate une contamination liée à l'environnement, les établissements d'aquaculture en question pourraient, sur base de critères fixés par le Comité scientifique, être disculpés et on pourrait proposer des mesures adéquates correspondantes. Il est à remarquer que le poisson n'est pas mis sur le marché et

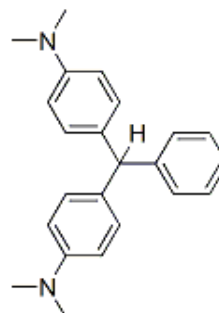
qu'il est détruit, qu'il s'agisse d'un usage frauduleux de VM ou d'une contamination environnementale.

IDENTIFICATION DES DANGERS

Structure du vert malachite



Vert malachite
(comme hydrochlorure ou oxalate)



vert leucomalachite

Applications du vert malachite

Le VM est un colorant synthétique commercial qui est/était utilisé pour diverses applications, par ex. pour colorer des étoffes (soie, laine, jute, cuir, coton) et du papier, comme additif et colorant alimentaire, comme indicateur de pH, dans l'industrie acrylique (BfR, 2007 ; Srivastava *et al.*, 2004).

Le colorant triphénylméthane VM a été utilisé dans les aquacultures du monde entier pour le traitement des infections fongiques et parasitaires du poisson. Il était notamment utilisé comme désinfectant général de l'alevinerie en vue de traiter les œufs de poissons contre les affections fongiques et de lutter contre les ectoparasites. Le VM s'avérait également efficace dans le traitement de la 'néphrite proliférative', une affection protozoaire systémique de la truite. Le VM était utilisé parce qu'il est peu coûteux, efficace et plus facilement disponible.

Le dosage du VM varie de 100 ppm (appliqué en tamponnant durant quelques secondes), à 0,1 ppm (utilisé dans des traitements de plus longue durée dans les viviers d'élevage) (BfR, 2007). L'utilisation du VM est interdit en Europe depuis 1999.

Analyse

Le VM est très instable et difficile à quantifier. Plusieurs méthodes de détermination des résidus de VM ont été décrites dans la littérature, comme notamment :

- 'liquid chromatography tandem mass spectrometry' (limite de détection = 0.2 ppb) (LC-MS-MS) (Bergwerff & Scherpenisse, 2003)
- 'High performance liquid chromatography' (HPLC) avec détection photométrique VIS (limite de détection = 1 ppb) (USFDA 2004; Afssa, 2002)
- spectrométrie (limite de détection = 1,2 ppb) (Pourreza & Elhami, 2007)

On peut retrouver plus de détails concernant ces méthodes en consultant les références citées.

CARACTERISATION DES DANGERS

Toxicité

Les connaissances scientifiques concernant la toxicité du VM et du VLM chez les animaux de laboratoire et chez l'homme, ainsi que chez les poissons, sont encore incomplètes (BfR, 2007; Afssa, 2002). Selon une opinion de l'EFSA, le VM et le VLM doivent être considérés comme des colorants génotoxiques et/ou carcinogènes (EFSA, 2005a).

La plupart des études concernent l'exposition orale. Dans certaines études avec des animaux de laboratoire, le VM a été associé à une toxicité hépatique, à l'anémie, à des anomalies de la glande thyroïde et à des effets néfastes sur le développement du fœtus. Il y a des indices que le VM et le VLM sont carcinogènes et mutagènes *in vivo* (BfR, 2007; Health Canada, 2005; Srivastava *et al.*, 2004; Afssa, 2002).

Selon Health Canada, le VM a un potentiel mutagène *in vitro* faible chez les bactéries. L'induction de dommages à l'ADN sous la forme d'adduits est indirecte et réversible. Par conséquent, il n'y a pas de preuve suffisante de la génotoxicité *in vivo* du VM. Par contre, le VLM peut être considéré comme étant mutagène et clastogène *in vivo* (Health Canada, 2005; UK COM & COC, 2004).

Aux USA, des études ont été réalisées concernant la toxicologie et la carcinogénicité du chlorure de VM et du VLM chez les rats et les souris dans le cadre du "National Toxicology Program" (Culp, 2004; NTP, 2004). Il y avait des indices de carcinogénicité du chlorure de VM et du VLM chez les rats, et du VLM chez les souris (UK COM & COC, 2004).

En ce qui concerne la toxicité aiguë, des valeurs LC₅₀ de 30,5 µg/l à 383 µg/l ont été rapportées pour le poisson (respectivement pour la brème, le 'bluegill' et le saumon Coho), et des valeurs LD₅₀ comprises entre 50 et 275 mg/kg de poids corporel (oral) pour les rats Wistar (BfR, 2007)³. Health Canada mentionne sur base de l'étude NTP 2004 (NTP, 2004) une 10 % 'benchmark dose' (BMD) de 36 mg/kg de poids corporel / jour et une 'lower benchmark dose' (BMDL) de 20 mg/kg de poids corporel / jour.⁴

L'Agence alimentaire française Afssa a proposé en 2002 une DJA ('dose journalière acceptable') provisoire de 0,15 µg/kg de poids corporel / jour (Afssa, 2002). Toutefois, dans un rapport récapitulatif en préparation d'une évaluation du risque concernant le VM, qui sera effectuée par le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), le BfR allemand estime que par manque de données, il est impossible de fixer une DJA (BfR, 2007). Food Standards Australia New Zealand a tiré une même conclusion (FSANZ, 2005). Comme le VM connaît plusieurs applications (applications vétérinaires, colorant pour articles de consommation, colorant alimentaire illégal), une approche holistique est nécessaire pour le développement d'une évaluation du risque.

Le BfR et FSANZ ont calculé sur base de quantités de VM et de VLM détectées dans du poisson une MOE ('margin of exposure') supérieure à 10.000 (BfR, 2006)⁵. D'après l'EFSA, une MOE supérieure à 10.000 correspond à un risque carcinogène faible à négligeable; le composant concerné peut être traité avec une faible priorité.

³ LD₅₀ et LC₅₀: respectivement la dose et la concentration donnant 50 % de létalité

⁴ La 'benchmark dose' ou BMD est un point de référence standardisé qu'on obtient par modélisation mathématique de données expérimentales venant d'essais sur animaux. La BMD estime la dose donnant une réaction faible mais mesurable (généralement 5 ou 10 % d'incidence au dessus du contrôle). La 'lower benchmark dose' ou BMDL est la limite inférieure de l'intervalle de fiabilité de 95 % de la BMD.

⁵ La 'margin of exposure' ou MOE est le ratio entre un point donné sur la courbe dose-réaction et l'exposition.

Toutefois, les composés qui sont aussi bien génotoxiques que carcinogènes ne peuvent pas être sciemment ajoutés à des denrées alimentaires ni être utilisés à un stade antérieur de la chaîne alimentaire si leurs résidus sont génotoxiques et carcinogènes. L'approche MOE ne peut être appliquée que dans les cas où des composants tant génotoxiques que carcinogènes ont été trouvés dans des denrées alimentaires, quelle que soit leur origine, et où il y a un besoin de situer les risques éventuels pour ceux qui ont été exposés à ces composants (EFSA, 2005b).

Sur base d'une évaluation du risque, Health Canada est parvenu à la conclusion que le risque potentiel de la consommation de poisson présentant des teneurs en résidus de VM et de VLM inférieures à 1 ppb⁶ est négligeable pour l'homme, même dans l'hypothèse d'une consommation quotidienne pendant une vie entière de poisson présentant une telle teneur en résidus (Health Canada, 2006).

Facteurs influençant la toxicité

Dans Srivastava *et al.* (2004), il est fait référence à des études suggérant que la toxicité pour plusieurs espèces de poisson est influencée par divers facteurs tels la température, le pH, la dureté et l'oxygène dissous dans l'eau. La toxicité du VM augmenterait à température plus élevée (NTP, 2004). La toxicité du VM serait également influencée par la présence d'ions Ca²⁺ et de composants humiques. Le colorant qui est chargé positivement entrerait en concurrence avec les ions Ca²⁺ pour les sites de liaison chargés négativement sur les composants humiques. La survie des poissons qui ont été exposés au VM est la plus élevée dans l'eau ayant un faible ratio de Ca²⁺/substances humiques (Meinelt *et al.*, 2001, cités par Srivastava *et al.*, 2004).

Absorption, distribution, métabolisme et élimination chez les poissons

Le VM est rapidement absorbé via la peau et les branchies des poissons. Cette absorption est plus rapide lorsque le pH et la température de l'eau sont plus élevés. Le VM est ensuite entraîné dans le flux sanguin et se diffuse entre différents tissus et organes. Dans les cellules, et notamment au niveau du foie, le VM est rapidement métabolisé. Les métabolites, dont la principale est le VLM, sont ainsi stockées dans la graisse, les muscles, les reins et le foie. Tandis que le VM serait rapidement éliminé par l'organisme, l'élimination du VLM serait lente, en particulier dans la graisse (Afssa, 2002). En général, on sait peu de choses sur le métabolisme du VM dans le poisson ou dans d'autres espèces (Health Canada, 2005; NTP, 2004).

Dans les poissons qui ont été traités avec du VM, 80 % et plus du VM est absorbé et transformé en VLM. La demi-vie du VLM dans les muscles des truites serait de 40 jours. C'est vraisemblablement pourquoi la plus grande partie des résidus illégaux se retrouvent dans le poisson sous la forme de VLM (Health Canada, 2005; NTP, 2004; USFDA, 2004).

Lorsque des saumons ou des truites adultes sont mises une seule fois ou plusieurs fois dans des bains de VM, on trouve des résidus de VM et de VLM dans leurs muscles. Les concentrations de VM et de VLM dans les muscles seraient inférieures à 10 µg/kg soit 12 mois après le dernier bain à 12 jusque 14°C, soit 38 jours après le dernier bain à 16°C. Ces différences peuvent partiellement s'expliquer par des différences de conditions expérimentales et de méthodologie analytique (Afssa, 2002).

⁶ valeur qui est appliquée comme directive intérimaire; voir plus loin

La pharmacocinétique du VM et du VLM dépendrait notamment de la température. L'élimination du VM et du VLM serait plus rapide lorsque la température de l'eau est plus élevée (Afssa, 2002). La vitesse d'élimination du VLM serait en outre liée à la teneur en graisse du poisson (Plakas *et al.*, 1996).

Les études pharmacocinétiques démontrent cependant nettement la persistance potentielle des résidus de VM et de VLM dans les muscles et la peau du poisson (Afssa, 2002).

REPONSE AUX QUESTIONS POSEES

1. La présence de résidus de VM et de VLM dans le poisson d'élevage peut-elle être provoquée par une contamination environnementale ?

Il faut faire une distinction entre une contamination diffuse généralisée de l'environnement (par ex. des PCB et des dioxines qui sont omniprésentes dans l'environnement comme contamination de fond) et une pollution locale ou 'hot spot' (due, par ex., à la présence de PCB et dioxines dans un établissement donné à des niveaux de contamination élevés).

En ce qui concerne les aquacultures concernées, une contamination globale semble exclue et il s'agirait d'une contamination locale de l'étang, très vraisemblablement consécutive à un usage antérieur intensif de VM comme fongicide. Toutefois, un lien direct entre le V(L)M dans les sédiments et le V(L)M dans le poisson est difficile à démontrer. Jusqu'à présent, il n'y a pas de données disponibles concernant la corrélation entre la teneur en V(L)M dans les sédiments des étangs et la teneur en V(L)M dans les produits d'aquaculture.

En Finlande notamment, on est confronté à une problématique similaire. On y a trouvé également du VM et du VLM dans les sédiments d'étangs d'aquaculture en des concentrations variant entre 1 et 200 ppb (communication interne avec l'agence alimentaire finlandaise Evira). Dans la littérature également il est suggéré qu'il n'est pas à exclure que la présence de résidus de VM et de VLM dans le poisson d'élevage soit due à une contamination environnementale (BfR, 2007; Health Canada, 2006; Srivastava *et al.*, 2004), soit par déversement soit par persistance dans les sédiments des étangs plusieurs années après la cessation d'utilisation de VM dans les établissements d'aquaculture. On ne sait pas clairement dans quelle mesure le VM serait un contaminant inévitable, et un complément d'enquête sur les sources possibles de contamination est nécessaire (Health Canada, 2006).

La FEAP (Federation of European Aquaculture Producers) souhaite attirer l'attention de la Commission européenne sur la problématique relative aux résultats d'analyse positifs pour le VM dans le poisson dus à une pollution environnementale (FEAP, 2006).

2. Est-il possible de formuler des recommandations concernant :

a) des critères qui permettraient aux agents de l'AFSCA de différencier la présence de résidus dans le poisson due à un traitement des animaux, par rapport à une contamination environnementale;

Dans la littérature scientifique, il n'y a pas de données disponibles permettant une telle différenciation. Il peut, certes, y avoir des indications dans le sens d'une contamination environnementale comme cause possible de la présence de résidus de VM dans le poisson (voir 2b).

b) les conditions pouvant entraîner une contamination environnementale du site (par ex. le temps écoulé entre l'utilisation du produit et la contamination du site, le type de production, le type de site : terre/béton, quantité et type de sédiments, etc.);

Si le poisson contaminé par des résidus de VM a été élevé dans un étang en béton, on peut exclure une pollution environnementale, car les viviers d'élevage en béton sont régulièrement nettoyés et désinfectés.

En Belgique, la truite arc-en-ciel est essentiellement élevée dans des viviers en béton, alors que la fario est élevée principalement dans des viviers de terre. On peut donc prélever des échantillons de truites fario visant spécifiquement la détection d'une pollution environnementale.

Au cas où des résidus de VM sont détectés dans le poisson, il serait intéressant d'effectuer une enquête sur le terrain. Les viviers de terre (et parfois aussi de béton) sont généralement alimentés par de l'eau de rivière. En pareils cas, on pourrait vérifier une éventuelle pollution au V(L)M en amont et en aval. Un établissement d'aquaculture peut, en effet, être contaminé par un autre établissement d'aquaculture qui est établi en amont et qui applique frauduleusement du VM (Idem pour une pollution industrielle).

On pourrait aussi notamment vérifier si des cas antérieurs de poisson contaminé par du V(L)M sont déjà connus dans l'établissement, ou si on peut observer une diminution de la teneur en V(L)M du poisson / des sédiments de l'étang, quelles activités sont / ont été exercées en amont de l'établissement, etc.

c) les mesures que peuvent prendre les établissements d'aquaculture pour éliminer / réduire cette pollution environnementale afin que l'on ne retrouve plus de résidus dans le poisson ou que la concentration des résidus soit inférieure à la MRPL.⁷

- Il ressort de la littérature que la bioaccumulation et toxicité du VM et du VLM pour les poissons serait fonction de la température, du pH, de la dureté et de la quantité d'oxygène dissous dans l'eau, et du ratio de Ca^{2+} /composants humiques. Il devrait être envisagé dans quelle mesure on peut conseiller aux éleveurs de vider l'étang et ajouter la chaux. Un passage temporaire à des conditions aérobies pourrait promouvoir la dégradation microbienne de VM. D'autre part, il est nécessaire d'examiner à fond quelle sera l'influence d'une augmentation du pH (et des teneurs Ca^{2+}) de l'eau sur la stabilité de VM dans l'eau et l'absorption de VM par les poissons.

- Si les sédiments peuvent servir de réservoir au VM, il faut les éliminer. Une telle mesure n'est, certes, pas toujours possible d'un point de vue pratique.

- Une autre possibilité d'éliminer le VM est la dégradation microbienne par l'administration des substances spécifiques et/ou des nutriments. Papunitti *et al.* (2006) ont démontré que le VM lié à l'amidon de froment était entièrement dégradé par le champignon *Fomes sclerodermeus* (Papinutti *et al.*, 2006). La dégradation

⁷ Il est à remarquer que la MRPL ou limite minimale de performance requise ('minimum required performance limit') correspond à la teneur minimale d'un analyte qui doit être détectée et confirmée dans un échantillon. Le but de la MRPL est d'harmoniser les performances d'analyse des laboratoires impliqués dans l'analyse d'échantillons officiels pour la détection de résidus de substances pour lesquelles aucune teneur tolérable n'a été fixée (voir également les termes de référence).

était fonction du pH. Toutefois, d'autres recherches sont nécessaires car le développement microbien pourrait également encourager des affections parasitaires.

3. Existe-t-il à ce jour des éléments permettant de déceler l'existence d'une toxicité plus faible des résidus de VM et de VLM en cas de contamination environnementale ? Dans l'affirmative, faudrait-il fixer une MRPL / limite d'action différente dans le cas d'une contamination environnementale, et laquelle ?

Malgré le fait qu'il ressort de la littérature que la bioaccumulation et toxicité du VM et du VLM dépendrait, pour les poissons, de la température, du pH, de la dureté de l'eau et de l'oxygène dissous dans l'eau et du ratio de Ca^{2+} /composants humiques, ceci ne change rien à la toxicité du VM et du VLM pour l'homme, laquelle dépend de la concentration de ces composés dans le poisson.

A titre d'information :

- Health Canada applique une tolérance zéro pour le VM dans le poisson destiné à l'industrie alimentaire. Sur base d'une évaluation du risque et de la possibilité que le VM puisse être un contaminant inévitable, Health Canada conseille toutefois comme directive intérimaire que le poisson ayant des résidus de VM et de VLM en une concentration inférieure ou égale à 1 ppb puisse être admis au commerce, à condition qu'une enquête exclue clairement l'usage illégal de VM pendant le cycle de vie du poisson d'élevage (Health Canada, 2006).
- Le Japon appliquerait une limite d'action de 5 ppb (Health Canada, 2006).

CONCLUSION

La présence de VM et de VLM dans le poisson d'élevage pourrait être une conséquence d'une pollution de l'environnement (déversement, ou conséquence de l'utilisation historique comme médicament). Un lien direct est jusqu'à ce jour scientifiquement difficile à démontrer. De plus, il n'y a pas suffisamment d'informations disponibles concernant l'ingestion, la distribution, la bio-accumulation de résidus de V(L)M dans le poisson, sur une éventuelle variation interspécifique, sur la dégradation du V(L)M dans l'environnement, ...

Deux types de mesures sont préconisés :

- Réaliser un suivi et une enquête approfondie pour confirmer la plausibilité d'une contamination historique du site (type d'étang, origine de l'eau, présence d'autres piscicultures en amont, informations sur épisodes de contamination antérieurs (en quelle année et quelles concentrations mesurées), mesures de MG et LMG dans sédiments, évolutions des teneurs détectées, ...)
- Prendre des mesures d'assainissement comme, par exemple, la vidange de l'étang, le dragage de l'étang avec enlèvement des sédiments déposés sur le fond et sur les berges (si pratiquement possible). En ce qui concerne, les possibles traitements (chaulage, stimulation de la dégradation microbienne), il est nécessaire de collecter davantage d'informations sur l'efficacité, sur de possibles inconvénients et sur la faisabilité.

Finalement, le Comité scientifique souhaite signaler la nécessité de développer et agréer des médicaments pour animaux efficaces en aquaculture afin de pouvoir offrir une alternative à la possible application frauduleuse des produits comme le vert de malachite.

Au nom du Comité scientifique

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert
Président
Bruxelles, le 24 septembre 2007

RÉFÉRENCES

Aitcheson S., Arnett J., Murray K. & Zhang J. (2000) Removal of aquaculture therapeutants by carbon adsorption. 1. Equilibrium adsorption behaviour of single components. *Aquaculture* 183 (3-4), 269-284.

Bergwerff A. & Scherpenisse P. (2003) Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *Journal of Chromatography B* 788, 351-359.

BfR (2007) Collection and pre-selection of available data to be used for the risk assessment of malachite green residues by JECFA – Summary report / August 24, 2007.

BfR (2006) Bewertung der Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans 2005. Gesundheitliche Bewertung Nr. 042/2006 des BfR vom 23. August 2006.
[http://www.bfr.bund.de/cm/208/bewertung_der_ergebnisse_des_nationalen_rueckstandskontrollplans_2005.pdf]

Culp S. (2004) NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic. Rep. Ser.* 71, 1-F10.

EFSA (2005a) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission to Review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU. (Question number EFSA-2005-082) *The EFSA Journal* 263, 1-73.
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/afc/afc_opinions/1127.Par.0001.File.dat/afc_op_ej263_illegaldyes_en1.pdf]

EFSA (2005b) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. (Request No EFSA-Q-2004-020) *The EFSA Journal* 282, 1-31.
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/sc_committee/sc_opinions/1201.Par.0002.File.dat/sc_op_ej282_gentox_en3.pdf]

FEAP (2006) Malachite green and zero tolerance, Resolutions voted by the Presidents Meeting, Praag. [http://www.aquamedia.org/feap/resolutions/resolution2006l_en.asp]

FSANZ (2005) Report on a survey of chemical residues in domestic and imported aquacultured fish. A national survey conducted under the coordinated food survey plan with participation by food regulatory agencies in all Australian States and Territories. Food Standards Australia New Zealand, November, 2005.

[http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Chemical%20Residues%20in%20Fish%20Survey.pdf]

Health Canada (2006) Federal government revises its approach to malachite green in aquacultures fish and fish products – News Release.

[<http://www.inspection.gc.ca/English/corpaffr/newcom/2006/20060403e.shtml>]

Health Canada (2005) Malachite green chloride and leucomalachite green – risk assessment for the occurrence of residue levels up to 2 ppb in an aquaculture facility – November 2005.

Nelson C. & Hites R. (1980) Aromatic amines in and near the Buffalo River. *Environ. Sci. Technol.* 14, 1147-1149.

NTP (2004) NTP Technical Report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. June 2004 NIH Publication No. 04-4416 U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health.

[http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST_rpts/tox071.pdf]

Papinutti L., Mouso N. & Forchiassin F. (2006) Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran-*Fomes sclerodermeus*. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 848-853.

Plakas, S. M., El Said, K. R., Stehly, G. R., Gingerich, W. H., and Allen, J. L., 1996, Uptake, tissue distribution and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 1427–1433.

Pourreza N. & Elhami S. (2007) Spectrophotometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-100. *Anal. Chim. Acta.* 596(1), 62-5.

Srivastava S., Sinha R. & Roy D. (2004) Review: Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology* 66, 319-329.

UK COM & COC (2004). UK COM & COC (United Kingdom Committee on Mutagenicity and Carcinogenicity) of Chemicals in Food, Consumer products and the Environment. Joint COM and COC statement on mutagenicity and carcinogenicity of malachite green and leucomalachite green, December 2004.

<http://www.Advisorybodies.doh.gov.uk/com/mglmg.htm>

US FDA (2004) Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Salmon with *In-Situ* Oxidation and Liquid Chromatography with Visible Detection. Andersen W., Roybal J. & Turnipseed S. [<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4334.html>]