

**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 E**

---

**"B.37 VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN NA ACUTE BLOOTSTELLING**

**1. METHODE**

**1.1. Inleiding**

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

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

Zie ook de algemene inleiding deel B.

**1.2. Definities**

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

Vertraagde neurotoxiciteit is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieën in het ruggemerg en perifere

zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

### 1.3. Referentiestoffen

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

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

### 1.4. Principe van de testmethode

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

### 1.5. Beschrijving van de testmethode

#### 1.5.1. Voorbereidingen

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

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

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

bepaald.

## 1.5.2. Proefomstandigheden

### 1.5.2.1. Proefdieren

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

### 1.5.2.2. Aantal en geslacht

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

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

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

### 1.5.2.3. Dosisniveaus

Om het dosisniveau in het hoofdonderzoek vast te stellen moet een vooronderzoek worden verricht met een voldoende aantal hennen en dosisniveaugroepen. Er dient, om een juist dosisniveau voor de hoofdstudie te kunnen vaststellen, normaal gesproken enige mortaliteit op de treden in deze voorstudie. Om echter sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, kan atropine of een ander preventief middel, waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neurotoxische reacties, worden toegediend. Voor het vaststellen van de maximale

niet-letale dosis van teststoffen kan een aantal verschillende methoden worden gebruikt (zie methode B.1bis). Gegevens uit eerdere onderzoeken bij de hen of andere toxicologische gegevens kunnen ook nuttig zijn bij de keuze van de dosis.

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

#### 1.5.2.4. Limiettest

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

#### 1.5.2.5. Observatieperiode

De observatieperiode dient 21 dagen te zijn.

#### 1.5.3. Procedure

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

##### 1.5.3.1. Algemene observatie

Het observeren moet onmiddellijk na het toedienen beginnen. Alle hennen moeten gedurende de eerste twee dagen enkele malen per dag worden geobserveerd en daarna ten minste eenmaal per dag over een periode van 21 dagen of totdat de dieren worden gedood. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur van abnormaal gedrag. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlamingsverschijnselen. De hennen die zijn geselecteerd voor pathologie moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden

genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren en dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

#### 1.5.3.2. Lichaamsgewicht

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

#### 1.5.3.3. Biochemie

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

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

#### 1.5.3.4. Macroscopische necropsie

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

#### 1.5.3.5. Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht.

Het weefsel moet in situ worden gefixeerd door perfusietechnieken. Onder andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengteas), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen.

## **2. GEGEVENS**

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

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

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

Numerieke resultaten moeten worden geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De gebruikte statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

## **3. RAPPORTAGE**

Verslag van de proefnemingen

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

Proefdieren :

- gebruikte stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, behuizing, enz.;
- individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

#### Proefomstandigheden :

- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar dat van toepassing is;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof;
- bijzonderheden over voedsel en water;
- motivering van de dosiskeuze;
- specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- naam van het eventueel toegediende preventieve middel en gegevens over de wijze van toediening.

#### Resultaten :

- gegevens over het lichaamsgewicht;
- gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar groep, met inbegrip van de mortaliteit;
- aard, ernst en duur van de klinische observaties (al of niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;
- necropsieverslagen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische bewerking van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### **4. LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 418 van de OESO.

**B.38 VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)**

# 1. METHODE

## 1.1. Inleiding

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

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

Deze 28-daagse test op vertraagde neurotoxiciteit geeft informatie over mogelijke gevaren voor de gezondheid die zich kunnen voordoen bij herhaalde blootstelling gedurende een beperkte tijd en over de relatie tussen dosis en respons. Tevens kan op grond van de test een schatting worden gemaakt van een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten, hetgeen van nut kan zijn bij het vaststellen van veiligheidseisen bij blootstelling.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

## 1.2. Definities

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

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

## 1.3. Principe van de testmethode

Aan hennen wordt dagelijks, gedurende 28 dagen, oraal een dosis van de teststof toegediend. De dieren worden tot 14 dagen na de laatste dosis tenminste eenmaal per dag geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlamningsverschijnselen.



Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de laatste toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Twee weken na de laatste dosis worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

#### 1.4. Beschrijving van de testmethode

##### 1.4.1. Voorbereidingen

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

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

Het toedienen van de teststof moet iedere dag plaatsvinden, zeven dagen per week, bij voorkeur door middel van een maagsonde of gelatinecapsules. Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maïsolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn. Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

##### 1.4.2. Proefomstandigheden

###### 1.4.2.1. Proefdieren

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

###### 1.4.2.2. Aantal en geslacht

In het algemeen moeten ten minste drie behandelde groepen en een controlegroep (vehiculum) worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de teststof wordt achterwege gelaten.

Iedere groep vogels moet uit zoveel hennen bestaan dat er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 14 dagen na de behandeling kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

#### 1.4.2.3. Dosisniveaus

De keuze dosisniveaus moet worden gemaakt met inachtneming van de resultaten van een acute test op vertraagde neurotoxiciteit en alle andere beschikbare gegevens over toxiciteit of kinetica van de teststof. Het hoogste dosisniveau moet gekozen worden met het doel toxische effecten te veroorzaken, bij voorkeur vertraagde neurotoxiciteit, zonder dat deze leiden tot sterfte of duidelijk lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus gekozen worden om het verband tussen dosis en respons aan te tonen en bij het laagste niveau te komen tot een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten.

#### 1.4.2.4. Limiettest

Als een test op een dosisniveau van ten minste 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij de verwachte blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

#### 1.4.2.5. Observatieperiode

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd gedurende de periode van blootstelling en 14 dagen daarna of totdat ze worden geobduceerd.

#### 1.4.3. Procedure

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks (zeven dagen per week) aan de proefdieren toegediend.

##### 1.4.3.1. Algemene observaties

Het observeren moet onmiddellijk na de eerste toediening beginnen. Alle hennen moeten gedurende de periode van 28 dagen waarop de stof wordt toegediend en gedurende 14 dagen daarna of totdat ze worden gedood, tenminste eenmaal per

dag worden geobserveerd. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur. Waarnemingen moeten onder meer, maar niet alleen, het observeren van abnormaal gedrag inhouden. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlamningsverschijnselen. De hennen moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

#### 1.4.3.2. Lichaamsgewicht

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

#### 1.4.3.3. Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen moeten binnen een paar dagen na toediening van de laatste dosis worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel (NTE) te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen drie vogels 24 uur en drie vogels 48 uur na de laatste dosis gedood. Als gegevens van het acute onderzoek of andere (bij voorbeeld toxicokinetische) onderzoeken er op duiden dat het doden na de laatste dosis beter op een ander tijdstip kan gebeuren, dan moet dat tijdstip aangehouden worden en de motivering worden gedocumenteerd.

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

#### 1.4.3.4. Macroscopische necropsie

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

#### 1.4.3.5. Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht. Het weefsel moet in situ worden gefixeerd door perfusietechnieken. Onder andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen. In eerste instantie moet microscopisch onderzoek worden verricht op de geprepareerde weefsels van alle dieren uit de controlegroep en de groep met de hoogste dosis. Als er aanwijzingen zijn voor effecten in de groep met de hoogste dosering, moeten ook dieren uit de groepen met lagere doseringen worden onderzocht.

## **2. GEGEVENS**

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

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

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

Numerieke resultaten moeten worden geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De te gebruiken statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

## **3. RAPPORTAGE**

Verslag van de proefnemingen

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

**Proefdieren :**

- gebruikte stam;
- aantal en leeftijd van de dieren;
- herkomst, behuizing, enz.;
- individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

**Proefomstandigheden :**

- bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar van toepassing;
- motivering van de keuze van het vehiculum;
- bijzonderheden over de toediening van de teststof;
- bijzonderheden over voedsel en water;
- motivering van de dosiskeuze;
- specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;
- motivering van de keuze van andere tijden voor de biochemische bepaling dan 24 en 48 uur.

**Resultaten :**

- gegevens over het lichaamsgewicht;
- gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar dosisniveau, met inbegrip van de mortaliteit;
- niveau waarop geen schadelijke effecten werden waargenomen (NOAEL);
- aard, ernst en duur van de klinische observaties (al dan niet reversibel);
- een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;
- necropsieverslagen;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- statistische bewerking van de resultaten, indien dit van toepassing is.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

#### **4. LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 419 van de OESO. "

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

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Volksgezondheid,  
M. COLLA

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

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,  
J. PEETERS

---

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).