



Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
*Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport*

**Internationale activiteiten gericht op het  
verminderen van LC<sub>50</sub> testen voor het  
vaststellen van acute toxiciteit in vissen**

RIVM Briefrapport 2015-0127  
Anne Kienhuis et al.





Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
*Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport*

## **Internationale activiteiten gericht op het verminderen van LC<sub>50</sub> testen voor het vaststellen van acute toxiciteit in vissen**

RIVM Briefrapport 2015-0127  
A. Kienhuis et al.

## Colofon

© RIVM 2015

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

Anne Kienhuis (auteur), RIVM  
ZhiChao Dang (auteur), RIVM  
Janine Ezendam (auteur), RIVM  
Betty Hakkert (auteur), RIVM

Contact:  
Anne Kienhuis  
GZB  
Anne.Kienhuis@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van Economische Zaken, in het kader van Opdracht 10B5.3 Implementatie van Alternatieven voor Dierproeven

Dit is een uitgave van:  
**Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu**  
Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven  
Nederland  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)

## Publiekssamenvatting

### **Internationale activiteiten ter vermindering van acute toxiciteitstesten in vissen**

Om de veiligheid van stoffen voor het milieu te beoordelen is informatie nodig over de mate waarin stoffen giftig zijn. Deze informatie wordt gedeeltelijk via dierproeven verkregen, zoals in vissen. Om zo min mogelijk dierproeven in te hoeven zetten, wordt gezocht naar alternatieven. In dat verband heeft het RIVM in kaart gebracht welke internationale activiteiten zijn ondernomen om het proefdiergebruik te verminderen voor studies naar de acute giftigheid van chemische stoffen voor vissen. Op dit moment vinden de meeste activiteiten hiervoor plaats bij de OESO (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling) die zorgt voor uniforme testrichtlijnen en bij ECHA (Europees Agentschap voor Chemische Stoffen) in het kader van de Europese stoffenwetgeving REACH.

Bij de acute giftigheidstesten voor vissen wordt gezocht bij welke concentratie 50 procent van de vissen sterft (zogenoeten LC<sub>50</sub>-methode). Deze testen zijn in principe verboden, omdat de dieren veel ongerief ondervinden. Ze worden alleen met ontheffing ingezet als er geen alternatieve methoden mogelijk zijn. Een van de alternatieven is om visembryo's voor deze test te gebruiken; een methode die is geaccepteerd door de OESO en onder bepaalde condities voor REACH mag worden gebruikt.

Visembryo's worden tot vijf dagen na bevruchting niet als proefdier aangemerkt, omdat ze dan nog niet zelfstandig kunnen eten en geen pijn en ongerief kunnen ervaren. Implementatie van deze test in de wettelijke richtlijnen kan het proefdiergebruik verminderen. Het is niet mogelijk dierproeven hiermee volledig te vervangen, doordat het gebruik van vissenembryo's niet voor alle (klassen van) chemische stoffen geschikt is. De OESO schrijft nu nog meerdere concentraties voor in de test met volwassen vissen. Het aantal proefdieren kan ook worden verminderd door de huidige test uit te voeren met één concentratie van de stof. Hiervoor wordt bij de OESO momenteel een strategie ontwikkeld.

Kernwoorden: acute toxiciteit, vissen, LC<sub>50</sub> test, milieurisicobeoordeling, alternatieven voor dierproeven, wettelijke kaders



## Synopsis

### **International efforts to reduce the use of acute toxicity tests in fish**

In order to assess the environmental safety of chemical substances, information must be obtained about their toxicity. Such information is partly derived from tests performed in animals. Researchers are currently looking for alternative methods to reduce the reliance on animal testing. The Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) has surveyed international efforts to reduce the number of animals in studies examining the acute toxicity of chemical substances to fish. At present, most activities in this area are being undertaken under the auspices of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), who develop harmonized test guidelines and the European Chemicals Agency (ECHA) for REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals).

Acute toxicity tests in fish seek to determine the concentration at which 50 percent of the fish die (the so-called 'LC<sub>50</sub> test'). In principle, such tests are prohibited because of their large impact on animal welfare. They may only be performed under an exemption when no alternative research methods are available. One alternative is to use fish embryos for this toxicity test. This method has been authorized by the OECD and can be used for REACH purposes.

Fish embryos up to five days after fertilization do not fall into the regulatory frameworks dealing with animal experimentation. One reason is that in this early life stage the embryos cannot eat independently or experience pain or discomfort. Implementation of the Fish Embryo Toxicity (FET) tests in the applicable regulatory guidelines may therefore reduce the number of experimental animals for acute toxicity testing. However, FET tests cannot completely replace animal testing because they are not suitable for all (classes of) chemical substances. The OECD guideline currently prescribes multiple concentrations in the fish acute toxicity test. The number of test animals used can also be reduced by performing acute toxicity tests in fish using a single concentration of the substance being studied. The OECD is currently developing a strategy for this.

Keywords: acute toxicity, fish, LC<sub>50</sub> test, environmental risk assessment, alternatives to animal testing, legislative frameworks





## Inhoudsopgave

### **Samenvatting — 9**

#### **1 Inleiding — 11**

#### **2 Overzicht van internationale activiteiten — 15**

2.1 OECD — 15

2.1.1 Limiet test — 15

2.1.2 FET test — 15

2.1.3 Update limiet test — 16

2.1.4 Geïntegreerde test strategie voor acute toxiciteit in vissen — 16

2.1.5 'Moribund' criteria — 17

2.2 REACH — 17

2.3 Stand van zaken in andere wettelijke kaders — 17

2.3.1 CLP — 17

2.3.2 Biociden — 18

2.3.3 Gewasbeschermingsmiddelen — 18

2.3.4 Diergeneesmiddelen — 18

#### **3 Conclusie — 19**

#### **4 Dankbetuiging — 21**

#### **5 Referenties — 23**



## Samenvatting

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de internationale activiteiten gericht op het verminderen en/of verfijnen van acute toxiciteitstesten (LC<sub>50</sub> testen) met vissen. Dit zijn testen waarin de concentratie wordt bepaald waarbij 50% van de blootgestelde vissen sterft. Deze informatie is belangrijk voor de milieurisicobeoordeling en classificatie van chemische stoffen. LC<sub>50</sub> testen zijn in principe verboden in Nederland, vanwege de hoge mate van ongerief, maar er mag ontheffing worden aangevraagd als er geen alternatief beschikbaar is. Informatie over acute toxiciteit in vissen is vereist in verschillende wettelijke kaders, zoals de REACH Verordening, de Biociden Verordening, de Gewasbeschermingsmiddelen Verordening, en de Diergeneesmiddelen Richtlijn.

In 2014 heeft het RIVM een briefrapport uitgebracht met de stand van zaken over acute toxiciteitstesten en de ontwikkelingen op het gebied van vervangen, verminderen en verfijnen (3V) van de huidige dierproef. In dat rapport komt naar voren dat in Nederland alleen in vissen acute toxiciteitstesten worden uitgevoerd, acute toxiciteitstesten in knaagdieren worden in Nederland niet uitgevoerd. Ook staat in dit rapport een overzicht van de ontwikkelingen op het gebied van 3V alternatieven om de dierstudies in vissen te verminderen of verfijnen. Aangezien de informatie gevraagd wordt in verschillende wettelijke kaders, was een van de aanbevelingen in 2014 om na te gaan wat er internationaal speelt op het gebied van verfijning en vermindering van de LC<sub>50</sub> test in vissen. Om dit te achterhalen zijn interviews gehouden met de Nederlandse vertegenwoordigers in de internationale gremia die zich bezig houden met milieurisicobeoordeling en classificatie van industriële chemische stoffen (REACH), biociden, gewasbeschermingsmiddelen en diergeneesmiddelen en met de gevaarsindeling en etikettering (CLP) van chemische stoffen.

Uit deze consultaties is gebleken dat internationaal de meeste activiteiten plaatsvinden bij de OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) en bij ECHA (European Chemicals Agency) in het kader van REACH. Bij de OECD wordt gewerkt aan zowel verfijning als vermindering van de huidige dierproef in volwassen vissen. Om de huidige dierproef te verfijnen, wordt gekeken of het mogelijk is om de LC<sub>50</sub> te baseren op sub letale effecten in plaats van op sterfte. Daarnaast wordt gewerkt aan een test strategie voor acute toxiciteit gericht op het verminderen van het aantal vissen voor dit doeleinde. Deze activiteiten lopen op dit moment nog bij de OECD en het RIVM is hierbij actief betrokken.

Een nieuwe test is de LC<sub>50</sub> test in vissen embryo's (FET: Fish Embryo Test). Deze test wordt wettelijk niet als dierproef aangemerkt, omdat de test binnen de eerste vijf dagen na bevruchting plaatsvindt. De FET test is gevalideerd en opgenomen in het OECD testrichtlijnen programma. De FET test kan niet voor alle klassen van stoffen worden gebruikt en zal daarom niet tot volledige vervanging van de dierproef in vissen leiden. Om de FET breed te kunnen toepassen voor de wettelijk verplichte risicobeoordeling dient deze test geïmplementeerd te worden in alle

relevante wettelijke richtlijnen. Dit is belangrijk, omdat dit nodig is om de test te mogen gebruiken voor de milieurisicobeoordeling. In de REACH richtlijnen is de FET test nu opgenomen, maar in de andere wettelijke kaders is dit nog niet het geval. Voor een bredere implementatie is meer inzicht nodig in zowel de voorspellende waarde van de FET test in vergelijking met de huidige dierproef als het toepassingsdomein van de FET test voor verschillende klassen van stoffen. De huidige activiteiten bij de OECD op dit vlak zullen naar verwachting bijdragen aan verdere vermindering en verfijning van de huidige dierproef in vissen

## 1 Inleiding

In 2014 heeft het RIVM gerapporteerd over de stand van zaken van LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen (Van der Ven & Ezendam, 2014). LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen zijn studies waarbij gezocht wordt naar de eenmalige dosering of concentratie waarbij 50% van de blootgestelde dieren sterft of in een conditie verkeren die zeer waarschijnlijk zal leiden tot letaliteit. De uitkomsten van deze studies worden gebruikt om de acute toxiciteit van een stof of geneesmiddel vast te stellen in het kader van de risicobeoordeling voor mens en milieu. Acute toxiciteit kan worden bepaald in zoogdieren, vissen, ongewervelden (o.a. watervlooien en regenwormen) en planten (algen). De keuze voor de testmethode is afhankelijk van de informatie die vereist is binnen een wettelijk kader. Aangezien het eindpunt in deze test sterfte is, is de mate van ongerief in termen van dierenwelzijn van deze testen ernstig. Daarom zijn LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen in zoogdieren, vogels en vissen in Nederland sinds 1997 verboden. Echter, er kan een ontheffing worden toegepast als er geen alternatieve methoden beschikbaar zijn. Uit het RIVM rapport uit 2014 is gebleken dat in Nederland alleen ontheffing is aangevraagd voor LC<sub>50</sub> testen in vissen. Het aantal proefdieren dat hiervoor jaarlijks wordt gebruikt is tamelijk constant en ligt tussen de 600-1000 vissen per jaar (NVWA, 2014, Van der Ven & Ezendam, 2014). In Europa liggen deze aantallen hoger, de meest recente gegevens tonen aan dat er in de EU 34000 vissen gebruikt worden voor LC<sub>50</sub> testen. In de EU worden ook acute toxiciteitstesten uitgevoerd met andere diersoorten, zoals muizen (EC, 2013).

Informatie over acute toxiciteit in vissen is vereist in verschillende wettelijke kaders (Tabel 1). De LC<sub>50</sub> gegevens worden onder andere gebruikt voor de gevaarsindeling (classificatie) van stoffen op basis van hun toxische effecten op het aquatisch milieu. Ook wordt de LC<sub>50</sub> gebruikt om de PNEC ('Predicted No-Effect Concentration') af te leiden, de concentratie waarbij naar verwachting geen nadelig effect optreedt in het aquatisch ecosysteem. De PNEC wordt gebruikt voor de milieurisicobeoordeling. De LC<sub>50</sub> wordt bepaald in een acute toxiciteitstest uitgevoerd met jonge of volwassen vissen. Deze test methode is beschreven in testrichtlijn (TG) 203 van de OECD ('Organisation for Economic Cooperation and Development'). In deze test worden vissen (minimaal 7 per groep) blootgesteld aan minimaal 5 concentraties van de stof. Om het aantal vissen te verminderen heeft de OECD binnen de bestaande TG203 de optie toegevoegd om te starten met een limiet test (de 'threshold approach') (OECD, 1992, 2010) (zie ook 2.1.1.). Als met de limiet test de risicobeoordeling kan worden uitgevoerd, kan dit leiden tot een vermindering van minstens 28 proefdieren per stof. Deze optie is opgenomen in verschillende richtlijnen van de Europese wetgevingen, waaronder die voor Gewasbeschermingsmiddelen en Biociden.

Om vermindering van het aantal LC<sub>50</sub> testen voor acute toxiciteit in vissen verder te kunnen bevorderen zijn in het rapport uit 2014 een aantal aanbevelingen gedaan (Van der Ven & Ezendam, 2014). Deze richten zich vooral op de implementatie van de FET (*Fish Embryo*

*Toxicity Test*) test. Dit is een test waarin de LC<sub>50</sub> wordt vastgesteld van embryo's van vissen. In 2013 is deze test door de OECD geaccepteerd als testrichtlijn (TG 236) (OECD, 2013). Het RIVM was hier nauw bij betrokken in het kader van een opdracht van het Ministerie van Infrastructuur & Milieu (I&M). Aangezien de FET test beperkingen heeft voor bepaalde chemische stoffen zal implementatie in de wettelijke kaders niet resulteren in volledige vervanging van de LC50 test in volwassen vissen, maar wel kunnen bijdragen aan de vermindering hiervan.

*Tabel 1: Europese wetgevingen waarin informatie over acute toxiciteit in vissen vereist is*

<b>Wetgeving</b>	<b>Achtergrond</b>	<b>Informatie vereisten</b>
REACH EC/1907/2006	De REACH verordening heeft als doel zorg te dragen voor een veilig gebruik van chemische stoffen voor mens en milieu. REACH staat voor Registratie, Evaluatie, Autorisatie (verlening van vergunningen) en restrictie (beperking) van Chemische stoffen.	De informatievereisten staan in de REACH Verordening (Annex VIII 9.1.3.). Informatie over acute toxiciteit in vissen is vereist voor chemische stoffen geïmporteerd of geproduceerd in hoeveelheden vanaf 10 ton per jaar. REACH artikel 13 geeft aan dat testen in vertebraten waar mogelijk worden vervangen door alternatieven als hiermee aan de regels voor het gebruik van alternatieven (Annex XI) wordt voldaan.
Classificatie, Labelling & Packaging (CLP) EC/1272/2008	Deze verordening waarborgt dat werknemers en consumenten in de EU duidelijk worden geïnformeerd over de gevaren van chemische stoffen en hun mengsels door middel van gevaarsindeling en etikettering. De verordening gebruikt de criteria voor gevaarsindeling en etiketteringsrichtlijnen afgesproken op het niveau van de Verenigde Naties en zijn vastgelegd in het "Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)".	De CLP verordening verplicht niet tot het testen van een stof of mengsel voor acute toxiciteit in vissen, maar gebruikt alle beschikbare data. In de praktijk zijn dat de data die vereist worden vanuit andere wettelijke kaders zoals REACH, Biociden en Gewasbeschermingsmiddelen. Deze data worden gebruikt om stoffen te classificeren volgens de GHS criteria.

<b>Wetgeving</b>	<b>Achtergrond</b>	<b>Informatie vereisten</b>
Biociden EC/528/2012	Deze verordening heeft als doel om biociden veilig op de Europese markt te brengen. Biociden zijn chemische stoffen die schadelijke organismen, zoals ongedierte of bacteriën, onderdrukken.	De informatie vereisten staan beschreven in de richtlijn van ECHA: <i>'ECHA Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume IV: Environment Part A: Information Requirements'</i> (ECHA, 2014a).
Gewasbeschermingsmiddelen EC/1107/2009	Deze verordening heeft betrekking op het toelaten van gewasbeschermingsmiddelen, die worden gebruikt om gewassen en planten te beschermen tegen schadelijke organismen. De risicobeoordeling is gericht op de actieve componenten van het middel met als doel om de gezondheid van mensen, dieren en het milieu te beschermen.	De informatievereisten voor de risicobeoordeling staan beschreven in de Annex deel B van de Verordening EC/283/2013. Dit document schrijft de OECD TG203 voor, waarbij gestart moet worden met een limiet test.
Diergeneesmiddelen 2009/9/EC	Deze richtlijn heeft betrekking op de marktoelating van diergeneesmiddelen door een competente autoriteit. Het dossier moet gegevens bevatten om de kwaliteit, werkzaamheid en veiligheid van het diergeneesmiddel te beoordelen voor de diersoort waarvoor het is ontwikkeld. Ook wordt de veiligheid voor het milieu beoordeeld.	De informatievereisten staan beschreven in de richtlijn van de European Medicines Agency (EMA) voor diergeneesmiddelen (Committee for medicinal products for veterinary use, CVMP): <i>Guideline on the Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II</i> , EMA, 2005). Deze richtlijn schrijft OECD TG203 voor om de informatie over acute toxiciteit in vissen te bepalen.

Kort samengevat zijn in 2014 de volgende aanbevelingen door het RIVM gemaakt:

- In 2014 verscheen een rapport van ECHA waarin staat dat ECHA (European Chemicals Agency) implementatie van de FET test (OECD TG236) binnen REACH (ECHA, 2014b) overweegt. Het is daarom aan te bevelen om de stand van zaken via Bureau REACH te blijven volgen.
- Informatie over acute toxiciteit is niet alleen vereist voor REACH. Het is daarom aan te bevelen om ook de Nederlandse vertegenwoordigers die actief zijn in de andere relevante wettelijke kaders te consulteren en te vragen of implementatie van de FET test in deze kaders wordt overwogen.
- Aangezien de FET test beperkingen heeft voor bepaalde chemische stoffen zal implementatie in de wettelijke kaders niet resulteren in volledige vervanging van de LC<sub>50</sub> test. Het integreren van verschillende informatiebronnen in een teststrategie wordt als meest kansrijk beschouwd om het aantal proefdieren te verminderen. Het is daarom van belang om te investeren in de ontwikkeling hiervan.

Het ministerie van Economische Zaken heeft het RIVM gevraagd om bovenstaande aanbevelingen verder uit te werken en hiervoor de Nederlandse vertegenwoordigers in de wettelijke kaders beschreven in Tabel 1 te consulteren. De deskundigen is gevraagd of er activiteiten plaatsvinden binnen hun commissie en/of werkgroepen die erop gericht zijn om LC<sub>50</sub> testen in vissen te verminderen of te vervangen. Specifiek zal ook gevraagd worden of implementatie van de FET test (OECD TG236) wordt overwogen binnen de wetgeving/richtlijnen. Een belangrijk punt in de consultaties betreft het achterhalen van de voorwaarden waaronder de FET test kan worden geïmplementeerd in de verschillende wettelijke kaders. De uitkomsten van deze consultaties worden beschreven in dit rapport



## 2 Overzicht van internationale activiteiten

### 2.1 OECD

#### 2.1.1 *Limiet test*

Om het aantal vissen voor acute toxiciteit te kunnen verminderen heeft de OECD binnen de bestaande TG203 de optie toegevoegd om te starten met een limiet test (OECD, 1992). Echter, de voorwaarden voor het uitvoeren van een limiet test zijn niet opgenomen in de testrichtlijn. Om die reden heeft de OECD een guidance document opgesteld waarin de aanpak voor deze limiet test voor acute vis toxiciteit is beschreven (OECD, 2010). Aangezien de vis niet altijd de meest gevoelige diersoort is, worden eerst gegevens uit acute toxiciteitstesten in algen en ongewervelde dieren verzameld. De laagste EC50 waarde uit deze testen wordt dan gebruikt als drempelwaarde. Vervolgens wordt de acute toxiciteitstest uitgevoerd bij deze concentratie, mits deze lager is dan 100 mg/L, de maximum concentratie in deze test. Als er geen sterfte optreedt in de limiet test, dan is de vis minder gevoelig dan de andere diersoorten. De gebruikte concentratie kan dan gebruikt worden als een surrogaat voor de LC<sub>50</sub> in de verdere risicobeoordeling. Als er wel sterfte optreedt, is de vis het meest gevoelig en moet de volledige test (met 5 concentraties) worden uitgevoerd om de LC50 vast te stellen.

#### 2.1.2 *FET test*

De OECD heeft in 2013 de in Duitsland ontwikkelde FET test opgenomen in haar testrichtlijnen programma. Deze test gebruikt 20 net bevruchte visembryo's per behandelde of controle groep. Het eindpunt van de test is, net als in de acute toxiciteitstest in vissen, LC<sub>50</sub>, gebaseerd op het aantal bevruchte embryo's dat 48 uur en 96 uur na blootstelling gestorven is. In de Europese richtlijn (86/609/EEC) voor de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt worden visembryo's niet als proefdieren aangemerkt tot het moment waarop ze in staat om zelf te eten en dus niet meer afhankelijk zijn van de dooierzak. Deze termijn is in vissen gesteld op 5 dagen na de bevruchting. Het achterliggende idee is dat op het punt dat embryo's zelfstandig gaan eten ze zeker pijn en ongerief kunnen ervaren (Strahle et al., 2012). De visembryo's die worden gebruikt in de FET test vallen binnen deze termijn en worden volgens de wet niet beschouwd als proefdieren.

De voorspellende waarde van de FET test is in een studie vergeleken met de huidige acute toxiciteitstest in volwassen vissen. In deze studie zijn de LC<sub>50</sub> waarden van 144 verschillende chemische stoffen gebaseerd op de test in volwassen vissen vergeleken met de LC<sub>50</sub> gebaseerd op de FET test. Deze studie toonde een correlatie aan tussen beide test methoden. De FET test bleek echter niet voor alle chemische stoffen geschikt (Belanger et al., 2013). De belangrijkste beperkingen betreffen het testen van stoffen die slecht in water oplossen en het testen van stoffen die vanwege hun massa en/of grootte slecht in het embryo kunnen worden opgenomen en kunnen resulteren in vals-negatieve uitkomsten. Wat betreft stoffen die voor hun toxische effecten moeten worden gemetaboliseerd, zijn vissen embryo's in staat tot

biotransformatie van stoffen. Echter, de metabole capaciteit van embryo's is niet altijd hetzelfde als die van jonge of volwassen vissen. Hierdoor kunnen stoffen waarvan bekend is dat ze acuut toxisch zijn in vissen, vals-negatief zijn in de FET test (OECD, 2013). Op basis van deze vergelijkende studie is een OECD validatiestudie voor de FET test uitgevoerd onder leiding van EURL ECVAM (*EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*). Deze validatie richtte zich op het vaststellen van de reproduceerbaarheid van de FET test binnen een laboratorium en tussen laboratoria. Aan dit onderzoek hebben 11 laboratoria, waaronder het RIVM, deelgenomen. De uitkomsten van deze validatiestudie (Belanger et al., 2013, Busquet et al., 2014, ECVAM, 2014) hebben bijgedragen aan de acceptatie van deze test als OECD testrichtlijn (OECD, 2013). Echter deze geeft aan dat de test niet geschikt is voor alle stoffen en als zodanig dus niet de test methode in volwassen vissen volledig kan vervangen. Het is van belang om het toepassingsdomein van de FET test beter in kaart te brengen en te vergelijken met dat van de test in volwassen vissen. Dit is van belang om vast te stellen voor welke (klassen van) stoffen de FET test geschikt is en voor welke niet.

### 2.1.3 *Update limiet test*

Recente ontwikkelingen binnen de OECD sluiten aan bij de aanbeveling om te investeren in een teststrategie voor het bepalen van de acute toxiciteit in vissen. In 2015 is het voorstel van Oostenrijk om een '*Integrated Approach for Testing and Assessment*' (IATA) voor de acute toxiciteit in vissen te ontwikkelen opgenomen in het werkprogramma van de OECD. Het doel van dit project is om een geïntegreerde test strategie voor acute vissentoxiciteit te ontwikkelen (zie 2.1.4). Daarnaast wordt binnen dit project gewerkt aan een update van de limiet test. Hiervoor wordt het 'guidance document' nummer 126' ('*Short guidance on the threshold approach for acute fish toxicity*', OECD, 2010) aangepast en zal de FET test worden opgenomen in de limiet test. Deze stapsgewijze procedure bevat criteria die gebruikt kunnen worden om te beslissen of acute vis toxiciteit kan worden bepaald met de limiet test op basis van TG203 (jonge of volwassen vissen) of TG236 (embryo's). De selectie van de concentratie is gebaseerd op het afleiden van een drempelwaarde uit betrouwbare acute toxiciteitsgegevens uit testen in algen of ongewervelden. De FET test wordt vervolgens uitgevoerd om vast te stellen of vissen meer of minder gevoelig zijn. Als de FET test gebruikt wordt in deze aanpak is er sprake van een verfijning van de dierproef. Een ad hoc expert groep van de OECD, waaraan ook het RIVM deelneemt, werkt aan de ontwikkeling van de IATA. Het document is naar verwachting in 2016 afgerond.

### 2.1.4 *Geïntegreerde test strategie voor acute toxiciteit in vissen*

Op initiatief van Oostenrijk wordt bij de OECD momenteel een IATA voor acute vissen toxiciteit ontwikkeld. In deze IATA zullen verschillende informatie bronnen worden geïntegreerd om een uitspraak te doen over acute toxiciteit. Dit betreft o.a. het verzamelen van beschikbare gegevens uit *in vivo* testen in vissen en uit testen in planten en algen en *in vitro* data. Ook fysisch-chemische eigenschappen van stoffen en *in silico* methoden (QSARs, read-across) kunnen onderdeel zijn van deze IATA. De bestaande gegevens en de informatie uit de *in silico* methoden worden in een 'weight-of-evidence' analyse gewogen. Op basis hiervan

wordt besloten de informatie voldoende is of dat er additionele testen moeten worden uitgevoerd. De eerste keuze is dan de FET test, vervolgens zal als laatste optie nog de LC50 test in vissen kunnen worden uitgevoerd. Deze IATA is momenteel nog in ontwikkeling.

#### 2.1.5 *'Moribund' criteria*

Binnen de 'Validation Management Group for Ecotoxicity Testing' (VMG-eco) van de OECD spelen momenteel discussies over het toepassen van 'moribund' criteria in de huidige testrichtlijn voor volwassen vissen. Dit betreft criteria die zijn gebaseerd op sub letale effecten om de LC<sub>50</sub> vast te stellen. Hierdoor kunnen vissen eerder uit de test worden gehaald om zo de mate van ongerief te verminderen. Opname in de test richtlijn zou leiden tot een verfijning van de dierproef. De discussies over dit onderwerp zijn nog niet afgerond bij de OECD. Punten die hier onder meer bij spelen zijn of deze criteria niet tot andere classificatie van een stof leiden en of deze eindpunten niet tot grotere variatie leiden.

## 2.2 REACH

De FET test wordt momenteel benoemd in de ECHA guidance en dit betekent dat deze test onder bepaalde condities voor REACH mag worden gebruikt. Welke condities dit zijn wordt momenteel verder ingevuld en Nederland draagt hier via Bureau REACH aan bij. De FET test wordt momenteel grondig geëvalueerd door ECHA, waarbij alle beschikbare LC<sub>50</sub> gegevens van de FET test en de acute toxiciteitstest in volwassen vissen worden vergeleken. De uitkomsten zullen gebruikt worden om de condities waaronder de FET test kan worden opgenomen in het richtsnoer van REACH zorgvuldig na te gaan. Het is nog niet bekend op welke termijn de definitieve besluitvorming hierover zal plaatsvinden.

## 2.3 Stand van zaken in andere wettelijke kaders

In deze paragraaf worden de uitkomsten van de consultaties met de Nederlandse vertegenwoordigers bij ECHA (European , EMA en EFSA samengevat per wettelijk kader.

### 2.3.1 CLP

In de CLP criteria worden geen specifieke test methoden beschreven, omdat de criteria worden toegepast op gegevens die zijn verzameld in andere wettelijke kaders, zoals REACH en de Verordeningen voor biociden en gewas-beschermingsmiddelen. De CLP criteria laat wel alternatieve methoden toe en verwijst daarvoor naar REACH Annex XI. In de praktijk wordt de FET test voor zover bekend nog niet gebruikt bij geharmoniseerde classificatie. Ook loopt er nog geen procedure voor de aanpassing van deze guidance.

De GHS waar de criteria voor CLP zijn vastgelegd geeft aan dat "validated and internationally accepted test methods" gebruikt mogen worden. In de praktijk betekent dit voor de EU dat er een door de OECD geaccepteerde testrichtlijn moet zijn. Echter, momenteel is nog onbekend hoe de FET test kan worden gebruikt voor classificatie. Om informatie verkregen in de FET test op termijn wel te kunnen gebruiken voor CLP is het van belang om te weten welke "score" uit de test overeenkomt met het classificatie criterium.

### 2.3.2 *Biociden*

Er spelen hier momenteel geen activiteiten. De Biociden werkgroep van ECHA wacht op de uitgebreide evaluatie van de FET test die in het kader van REACH wordt uitgevoerd.

### 2.3.3 *Gewasbeschermingsmiddelen*

In het EFSA panel voor gewasbeschermingsmiddelen en hun residuen (PPR: Plant Protection Products and their Residues) is de implementatie van de FET test niet besproken.

### 2.3.4 *Diergeneesmiddelen*

Implementatie van de FET test in de CVMP richtlijnen voor 'Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products' wordt nog niet overwogen door EMA. Een belangrijke reden is dat diergeneesmiddelen een specifieke klasse van stoffen zijn met diverse biologische eigenschappen en karakteristieken wat betreft metabolisme en bioactivatie. Het is nog niet helder of deze specifieke klasse van stoffen in het toepassingsdomein van de FET test past, omdat er geen studies zijn waarin een vergelijking is gemaakt tussen de uitkomsten van de FET test en de test in volwassen vissen voor diergeneesmiddelen. Ook is er onvoldoende bekend over het metabolisme in de embryo's. Om deze redenen neemt EMA implementatie van de FET test in haar richtlijn nog niet in overweging.

### 3 Conclusie

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de internationale activiteiten gericht op het verminderen en/of verfijnen van acute toxiciteitstesten (LC<sub>50</sub> testen) met vissen. Hiervoor zijn de internationale vertegenwoordigers die vanuit Nederland actief zijn in de relevante werkgroepen en/of commissies geïnterviewd. Op basis hiervan kan geconcludeerd worden dat de meeste internationale activiteiten momenteel plaatsvinden bij ECHA in het kader van REACH en bij de OECD. Bij het EFSA panel voor gewasbeschermingsmiddelen en hun residuen is dit onderwerp niet besproken, terwijl implementatie in de richtlijnen voor de Biociden Verordening afhangt van de uitkomsten van de ECHA evaluatie in het kader van REACH. Bij EMA is toepassing van de FET test voor de milieurisicobeoordeling van diergeneesmiddelen wel besproken, maar is besloten deze nog niet te implementeren. De reden hiervoor is dat er te weinig diergeneesmiddelen zijn getest in de FET test en het niet helder is of deze specifieke klasse van stoffen binnen het toepassingsdomein vallen.

Een belangrijk discussiepunt bij de implementatie van de FET test voor de beoordeling van de aquatische toxiciteit is de volgende overweging. De huidige dierproef in vissen wordt uitgevoerd met een beperkt aantal vissen. Samen met informatie vanuit de toxiciteit voor algen en die voor de watervlo, beide geen experimenten met gewervelde dieren, staat die model voor de acute toxiciteit van het aquatische ecosysteem. Dit is anders dan bij alternatieve methoden die worden ontwikkeld voor de humane risicobeoordeling, waar veelal knaagdieren worden gebruikt om de toxiciteit in mensen te voorspellen. In de vertaling van gegevens van een knaagdier naar de mens zitten diverse onzekerheden aangezien een knaagdier niet in alle gevallen hetzelfde reageert als de mens. Dit is niet het geval voor testen in vissen. In dit geval wordt een test in vissen met de LC<sub>50</sub> waarde gebruikt als onderdeel voor de acute toxiciteit van het aquatisch ecosysteem. Voor beleidsmakers en risicobeoordelaars is het daarom belangrijk om te weten hoe goed de FET de acute toxiciteit in volwassen vissen voorspelt. Als de voorspellende waarde minder is dan de bestaande test in volwassen dieren dan kan deze kleine afname van het gebruik van vissen in een toxiciteitstest een groot gevolg hebben voor de bescherming van het aquatische ecosysteem.

Bij de OECD is al veel bereikt om het aantal acute toxiciteitstesten in vissen te verfijnen, te verminderen en te vervangen, zoals de mogelijkheid om de limiet test uit te voeren binnen de huidige testrichtlijn. Daarnaast zijn de huidige activiteiten bij de OECD duidelijk gericht op verdere verfijning, vermindering en vervanging, zoals de ontwikkeling van een IATA voor acute toxiciteitstest. Het ontwikkelen van dergelijke test strategieën is een van de speerpunten van het RIVM voor alternatieven voor dierproeven (RIVM, 2013). Het RIVM is actief in de werkgroep die werkt aan de IATA en past haar kennis op het gebied van geïntegreerde test strategieën en de toepassing hiervan voor de risicobeoordeling van chemische stoffen hiervoor toe. De ontwikkelingen bij de OECD zullen in het komende jaar gedeeld worden met het

netwerk van Nederlandse vertegenwoordigers in de internationale gremia zodat zij dit in hun panels en commissies kunnen inbrengen.

## 4 Dankbetuiging

Dit briefrapport is gebaseerd op interviews met deskundigen van het RIVM. Onze dank gaat daarom uit naar: Martijn Beekman, Caroline Moermond, André Muller, Els Smit, Leo van der Ven en Gerrit Wolterink. We danken Charles Bodar en Dick Sijm voor de toetsing van dit briefrapport.





## 5 Referenties

- BELANGER, S. E., RAWLINGS, J. M. & CARR, G. J. 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem*, 32, 1768-83.
- BUSQUET, F., STRECKER, R., RAWLINGS, J. M., BELANGER, S. E., BRAUNBECK, T., CARR, G. J., CENIJN, P., FOCHTMAN, P., GOURMELON, A., HUBLER, N., KLEENSANG, A., KNOBEL, M., KUSSATZ, C., LEGLER, J., LILLICRAP, A., MARTINEZ-JERONIMO, F., POLLEICHTNER, C., RZODECZKO, H., SALINAS, E., SCHNEIDER, K. E., SCHOLZ, S., VAN DEN BRANDHOF, E. J., VAN DER VEN, L. T., WALTER-ROHDE, S., WEIGT, S., WITTERS, H. & HALDER, M. 2014. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul Toxicol Pharmacol*, 69, 496-511.
- EC 2013. COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT Accompanying document to the REPORT FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union Europese Unie (EU).
- ECHA 2014a. Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume IV: Environment Part A: Information Requirements.
- ECHA 2014b. The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation. . *Report ECHA-14-A-07*.
- ECVAM, E. 2014. EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing.
- EFSA 2008. Technical Guidance for assessing the safety of feed additives for the environment. Prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *The EFSA Journal* 842.
- EMA 2005. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP). Guideline on the Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II. . CVMP/VICH/790/03-FINAL.
- NVWA 2014. Zo doende 2013: Jaaroverzicht van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit over dierproeven en proefdieren. Utrecht: Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA).
- OECD 1992. Fish, Acute Toxicity Test, OECD TG203. Organization for Economic Cooperation and Development.
- OECD 2010. OECD. Series on testing and assessment No 126. Short guidance on the threshold approach for acute fish toxicity. . *ENV/JM/MONO(2010)17*.
- OECD 2013. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD TG236. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Organization for Economic Cooperation and Development.
- RIVM Ambities en strategie op het gebied van 3V-alternatieven voor dierproeven. Url: [http://www.rivm.nl/ambitie\\_en\\_strategie\\_AvD](http://www.rivm.nl/ambitie_en_strategie_AvD)

- STRAHLE, U., SCHOLZ, S., GEISLER, R., GREINER, P., HOLLERT, H., RASTEGAR, S., SCHUMACHER, A., SELDERSLAGHS, I., WEISS, C., WITTERS, H. & BRAUNBECK, T. 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol*, 33, 128-32.
- VAN DER VEN, L. T. & EZENDAM, J. 2014. Stand van zaken LD50/LC50 testen. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). RIVM Briefrapport 2014-0036.

**RIVM**

*De zorg voor morgen begint vandaag*