



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

## **Stand van zaken LD50/LC50 testen**

Verfijning, vermindering en vervanging van dierproeven  
en mogelijkheden tot interventies

RIVM Briefrapport 2014-0036  
L. van der Ven | J. Ezendam





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

## **Stand van zaken LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen**

Verfijning, vermindering en vervanging van dierproeven  
en mogelijkheden tot interventies

RIVM briefrapport 2014-0036  
L. van der Ven | J. Ezendam

## Colofon

© RIVM 2014

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.

Leo van der Ven  
Janine Ezendam

Contact:  
Janine Ezendam  
GZB  
Janine.Ezendam@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van Economische Zaken,  
in het kader van Opdracht 10B.5.3 NKCA

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)

## Publiekssamenvatting

Het RIVM heeft geïnventariseerd hoeveel proefdieren worden gebruikt voor testen die uitzoeken bij welke dosering of concentratie van een stof 50 procent van de dieren sterft (zogenoeten LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>-testen). Deze testen zijn in principe verboden en worden alleen met ontheffing toegepast als er geen alternatieve methoden mogelijk zijn. De inventarisatie is op verzoek van de staatssecretaris van Economische Zaken gemaakt.

Hieruit blijkt dat in Nederland jaarlijks voor dit type testen tussen de 570 en 1000 vissen gebruikt worden; in Nederland worden hiervoor geen andere diersoorten ingezet. Om in algemene zin het aantal dierproeven te verminderen is in de jaren zeventig van de vorige eeuw het zogeheten 3V-principe (Verminderen, Verfijnen of Vervangen) in de Wet op de dierproeven verankerd. Uit de RIVM-inventarisatie blijkt dat dit principe ook wordt ingezet bij de LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>-testen, maar het toepassen ervan is maatwerk en is nog niet voor alle chemische stoffen mogelijk.

De test kan bijvoorbeeld zodanig worden ingericht dat minder vissen nodig zijn, of dat zieke dieren eerder uit de test worden gehaald. Daarnaast kan bestaande kennis over stoffen met een chemisch verwante structuur gebruikt worden om de schadelijkheid van een stof te bepalen, waardoor het niet nodig is om een dierproef uit te voeren. Een ander alternatief is een zogenaemde visembryo-test, waarbij de toxiciteit van een stof wordt bepaald met testen bij pas bevruchte viseieren. Embryo's vallen de eerste dagen niet onder de Wet op dierproeven.

Dit laatste alternatief wordt nog niet praktisch gebracht omdat de visembryo-test nog niet in de Europese regelgeving voor chemische stoffen is opgenomen. Om de LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>-testen verder te verminderen is het belangrijk dat dit wel gebeurt. Het RIVM adviseert daarom om in overleg met de Nederlandse vertegenwoordigers in relevante Europese wettelijke kaders vast te stellen hoe en onder welke voorwaarden dit kan worden gerealiseerd. Bovendien is het belangrijk om te investeren in de ontwikkeling van een strategie waarin verschillende testen worden geïntegreerd, omdat dit de meest kansrijke manier is om de LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>-testen op termijn overbodig te maken.



## Abstract

RIVM investigated the number of animals used in toxicological tests which assess the dose or concentration of a chemical compound that produces 50 percent mortality (so-called LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> tests). Such tests are only permitted under exceptional license, if no alternative testing methods are available. This investigation was requested by the Minister of Economic Affairs.

The investigation shows that in recent years in the Netherlands, there is a fairly constant number of fish (570-1000) used in this type of tests, but no other species. There are methods to Reduce, Refine, or Replace animal use in this context (3R principle). The RIVM investigation showed that this principle is applied to the LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> tests, but this requires a tailored approach and is not possible for all substances.

The test can, for example, be adapted to use less fish, or affected fish can be removed from the test. A way to avoid animal testing is to use 'read-across'. In this method toxicity data of structurally-related chemicals are used to assess the toxicity of a chemical substance without performing new tests. Another alternative is the recently developed fish embryo test, in which the toxicity is assessed in freshly fertilized fish eggs. Fish embryos fall within the scope of the European Directive on the protection of animals used for scientific purposes. The application of 3R-alternative methods requires a tailored approach

The last alternative is not applied yet, since the fish embryo test is not implemented in regulatory frameworks for chemical substances. To further reduce LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>-tests it is important that the fish embryo test is implemented. RIVM recommends involving Dutch delegates in relevant European regulatory frameworks in the discussion how and under what conditions this can be achieved. It is also important to invest in the development of a strategy that combines different test methods. Such a strategy is the most promising way to replace the LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>-tests in the future.





## Inhoudsopgave

### **Inhoudsopgave – 7**

#### **Aanleiding – 8**

- 1 Overzicht van LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen in Nederland – 9**
- 2 3V alternatieven voor LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen – stand van zaken – 11**
- 3 Conclusies en aanbevelingen – 13**
- 4 Dankbetuiging – 15**

## Aanleiding

In februari 2014 heeft de Staatssecretaris Economische Zaken haar plan van aanpak voor dierproeven en alternatieven aan de Tweede Kamer voorgelegd. Dit stuk beschrijft de ambities en speerpunten op dit gebied<sup>1</sup>. Eén van de speerpunten betreft het uitfasen van LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen voor milieugerelateerde effecten. In het verleden heeft de Tweede Kamer vragen gesteld over de termijn en manier waarop deze testen kunnen worden uitgebannen. LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen zijn in Nederland sinds 1997 verboden, maar een ontheffing kan worden aangevraagd als er geen alternatieve testmethode beschikbaar is. De nieuwe Europese richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt staat niet toe dat de ontheffingsmogelijkheid ten aanzien van het verbod op deze testmethode volledig wordt afgeschaft. Wel mogen nationale bepalingen gehandhaafd blijven. Er zal elke vijf jaar opnieuw worden bekeken of er alternatieve methoden zijn die de huidige dierproef volledig kunnen vervangen.

De Staatssecretaris heeft gevraagd om in kaart te brengen welke testen het betreft, voor welke testen de meeste dierproeven worden gedaan en wat mogelijkheden voor interventies zijn binnen de kaders van REACH en de Europese richtlijn (betreffende dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt)<sup>1</sup>. In dit briefrapport wordt een overzicht gegeven van de stand van zaken betreffende de LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen wat betreft proefdiergebruik en 3V alternatieven (methoden om de dierproef te kunnen vervangen, verminderen of verfijnen). Ook zijn aanbevelingen geformuleerd om een verdere vermindering en op termijn vervanging van deze testen te bewerkstelligen.

<sup>1</sup> Kamerstuk 32336, nr. 27  
<http://www.tweedekamer.nl/kamerstukken/detail.jsp?id=2014D07261&did=2014D07261>

## 1 Overzicht van LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen in Nederland

LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen zijn acute toxiciteitsstudies waarbij gezocht wordt naar een dosering of concentratie waarbij 50% van de blootgestelde dieren sterft (letale dosering of concentratie LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>). Deze test wordt gebruikt voor het vaststellen van de concentratie voor chronische testen. Daarnaast is het vaststellen van acute toxiciteit voor milieugerelateerde effecten vereist in verschillende Europese wettelijke kaders. In de REACH verordening is dit verplicht voor stoffen die worden geproduceerd in een tonnage vanaf 10 ton/jaar. Deze testen zijn ook voorgeschreven in Europese verordening voor toelating van biociden en gewasbeschermingsmiddelen en de richtlijn voor de toelating van diergeneesmiddelen van EMA (European Medicines Agency). LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen moeten worden uitgevoerd volgens de Richtlijnen voor het testen van chemische stoffen van de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), in het Engels bekend als OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Voor het vaststellen van acute toxiciteit in het milieu zijn verschillende OECD test guidelines opgesteld.

De meest recente cijfers over gebruik van LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen die bij vergunninghoudende instellingen in Nederland zijn uitgevoerd komen uit "Zodoende 2012", dit is het jaarverslag over dierproeven opgesteld door de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA)<sup>2</sup>. Tussen 2009 en 2012 is geen ontheffing verleend voor LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen uitgevoerd in knaagdieren. Uit tabel 1 blijkt dat er jaarlijks wel ontheffing wordt verleend voor LC<sub>50</sub> testen in vissen uitgevoerd volgens OECD TG203 (de 'Fish Acute Toxicity test'<sup>3</sup>). Het aantal proefdieren dat hier jaarlijks voor wordt ingezet is tamelijk constant. In 2012 werden van de 906 vissen er 157 gebruikt voor onderzoek naar de schadelijkheid van industriële stoffen en 749 voor onderzoek naar stoffen die schadelijk (kunnen) zijn voor het milieu. De Zodoende geeft geen informatie over het wettelijk kader waarvoor deze testen worden toegepast. Op basis van deze gegevens kan dus niet worden vastgesteld of de LC<sub>50</sub> testen uitsluitend in het kader van REACH zijn uitgevoerd.

**Tabel 1: Proefdiergebruik voor LC<sub>50</sub> testen in Nederland**

Jaar	Aantal proefdieren (vissen*)
2012	906
2011	570
2010	1001
2009	661

\*In de jaren 2009-2012 werden uitsluitend LC<sub>50</sub> testen met vissen geregistreerd, uitgevoerd volgens OECD TG203.

<sup>2</sup> <https://www.vwa.nl/actueel/bestanden/bestand/2204744/zodoende-2012>

<sup>3</sup> [OECD TG 203 Fish acute toxicity test](#)



## 2 3V alternatieven voor LD<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> testen – stand van zaken

De REACH verordening stimuleert het gebruik van 3V-alternatieven voor het verkrijgen van informatie over acute toxiciteit. Omdat de afgelopen jaren uitsluitend LC<sub>50</sub> testen met vissen werden uitgevoerd beschrijft dit hoofdstuk de stand van zaken betreffende 3V alternatieven voor specifiek deze test.

### Vermindering

De OECD heeft een richtsnoer opgesteld gericht op het verminderen van proefdieren voor het vaststellen van acute toxiciteit<sup>4</sup>. Het is mogelijk om binnen OECD TG203 een beperkte test uit te voeren. In deze test worden de vissen niet aan de vijf voorgeschreven concentraties blootgesteld, maar alleen aan de hoogste concentratie (100 mg/L). Als er geen letaliteit wordt geobserveerd bij deze concentratie mag worden geconcludeerd dat de LC<sub>50</sub> hoger is dan 100 mg/L en dat de stof niet toxisch is voor vissen. Dit levert een vermindering van 28 proefdieren per stof op. Deze optie is opgenomen in verschillende wettelijke verordeningen, waaronder REACH en de biociden en gewasbeschermingsmiddelen verordening.

### Verfijning

Het verminderen van de mate van ongerief is een vorm van verfijning van een dierproef. In dit type testen kan verfijning worden verkregen door vissen die ernstige klinische verschijnselen vertonen uit de test te nemen, dus zonder daadwerkelijke sterfte af te wachten.

### Vervanging

REACH biedt de mogelijkheid om voor industriële chemicaliën 'read-across' toe te passen. Dit houdt in dat de beslissing over acute toxiciteit gebaseerd is op bestaande toxiciteitsgegevens van een stof die qua chemische structuur verwant is. Ook mogen binnen REACH eerder verzamelde toxiciteitsgegevens worden gebruikt in een 'weight of evidence' aanpak. Op deze manier is het mogelijk om de informatie te verkrijgen zonder een dierproef uit te voeren. Dat dit in de praktijk ook werkt blijkt uit een recent rapport van ECHA over het gebruik van alternatieven voor dierproeven binnen REACH<sup>5</sup>. Mede door het in toenemende mate toepassen van 'read-across' of 'weight of evidence' wordt slechts 43% van het vereiste aantal acute toxiciteitsstudies in proefdieren uitgevoerd. Het is wel belangrijk om te vermelden dat dit maatwerk betreft en dat vervanging van de LC<sub>50</sub> test niet voor iedere stof mogelijk is.

Verder is er een alternatieve test ontwikkeld om acute toxiciteit vast te stellen, welke gebruik maakt van visembryo's (OECD TG236: 'Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test'<sup>6</sup>). In de Europese richtlijn voor de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (Richtlijn 86/609/EEC) worden visembryo's niet als proefdieren aangemerkt tot het moment dat ze geacht worden ongerief te kunnen ervaren. Voor de zebravis embryo's die in

<sup>4</sup> [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)17&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)17&doclanguage=en)

<sup>5</sup> ECHA, 2014. The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation. Report ECHA-14-A-07-EN

<sup>6</sup> [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test\\_9789264203709-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en)

TG236 voorgeschreven worden is dit een termijn van vijf dagen na bevruchting. Een internationale validatie van deze test in zebravis embryo's is uitgevoerd door EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) in samenwerking met de OECD. In 2013 is deze test opgenomen in het testrichtlijnen programma van de OECD als TG236. Het principe van de FET test is dat bevruchte eitjes 96 uur worden blootgesteld aan verschillende concentraties van de teststof. De  $LC_{50}$  die wordt afgeleid uit deze test wordt gebruikt als indicatie voor acute toxiciteit in volwassen vissen. Deze validatie studie heeft aangetoond dat de test geschikt is voor een brede range van chemische stoffen. Uitzonderingen zijn stoffen die gemetaboliseerd moeten worden en stoffen die vanwege hun massa slecht in het embryo worden opgenomen. Dit betekent dat de test wel beperkingen heeft en niet voor alle stoffen kan worden toegepast.

### 3 Conclusies en aanbevelingen

Uit de meest recente gegevens van ECHA<sup>7</sup> blijkt dat er vooruitgang geboekt is in het verminderen van het gebruik van de LC<sub>50</sub> test binnen dit wettelijke kader. Een verdere vermindering kan worden bereikt als de FET test (OECD TG236) wordt geïmplementeerd in REACH. ECHA neemt de implementatie van de FET momenteel in overweging<sup>5</sup>. Om dit proces vanuit Nederland te ondersteunen is het aan te bevelen om met de Nederlandse vertegenwoordigers bij ECHA te overleggen in welke mate en onder welke voorwaarden de implementatie van OECD TG236 in de REACH verordening kan worden gestimuleerd.

Het is mogelijk dat de in Nederland uitgevoerde LC<sub>50</sub> testen in Nederland niet alleen voor REACH, maar ook voor andere wettelijke kaders zijn uitgevoerd. Het is daarom aan te bevelen om te verkennen of implementatie van de FET test in andere Europese richtlijnen kan leiden tot een vermindering van LC<sub>50</sub> testen. Relevante wettelijke kaders zijn de Biociden verordening, met een belangrijke rol voor ECHA, de Gewasbeschermingsmiddelen verordening, met een belangrijke rol voor EFSA (European Food and Safety Authority) en de wetgeving voor diergeneesmiddelen, met een belangrijke rol voor de European Medicines Agency (EMA).

EURL ECVAM heeft recent aanbevelingen gedaan om het implementatie proces in de verschillende wettelijke kaders te bevorderen<sup>8</sup>. Een belangrijk aspect bij het accepteren van een test door beleidsmakers is het onderbouwen van de robuustheid in vergelijking met de LC<sub>50</sub> test in volwassen vissen. In het OECD acceptatie traject is een database opgesteld die gegevens bevat van zowel de vis embryo test als de test in volwassen vissen<sup>9</sup>. Het is aan te bevelen om deze database uit te breiden met beschikbare data van meer chemische stoffen waarvoor LC<sub>50</sub> testen in volwassen vissen én in embryo's zijn uitgevoerd. Deze gegevens zijn van belang om de robuustheid van de test verder te onderbouwen en om vast te stellen voor welke chemische stoffen de FET test niet geschikt is. Industrieën en beleidsinstellingen die beschikken over deze gegevens zouden moeten worden gestimuleerd om deze data beschikbaar te stellen.

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 in volwassen vissen. Het is daarom van belang om te investeren in de ontwikkeling van geïntegreerde teststrategieën. Het integreren van verschillende informatiebronnen is het meest kansrijk om de huidige dierproef op termijn te vervangen. Geïntegreerde teststrategieën worden als zeer kansrijk beschouwd binnen de toxicologie en worden bijvoorbeeld binnen REACH al toegepast voor bepaalde toxicologische eindpunten. Wereldwijd worden langs deze lijn verdere initiatieven ontwikkeld en RIVM spant zich in om vernieuwing van zulke teststrategieën te concretiseren.

<sup>7</sup> [ECHA, 2014. The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation. Report ECHA-14-A-07-EN](#)

<sup>8</sup> [EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method \(ZFET\)](#)

<sup>9</sup> Belanger et al. 2013 Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. Environ Toxicol Chem 32: 1768-1783.





## 4 Dankbetuiging

Dit rapport is tot stand gekomen op basis van consultatie van onderstaande deskundigen:

Dr. Charles Bodar (RIVM/VSP)  
Dr. Peter Bos (RIVM/VSP)  
Dr. Rita From (NVWA)  
Dr. Betty Hakkert (RIVM/VSP)  
Prof. Dr. Coenraad Hendriksen (InTraVacc)  
Dr. Emily McVey (Ctgb)  
Dr. Mark Montforts (RIVM/VSP)  
Dr. Dick Sijm (RIVM/VSP)  
Dr. Theo Traas (RIVM/VSP)  
Ing. Peter van Vlaardingen (RIVM/VSP)

**RIVM**

*De zorg voor morgen begint vandaag*