

B.1 bis AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ – METODA FIXNÍ DÁVKY

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Podstatou metody je použití pouze středně toxických dávek v hlavní studii a dávky, u nichž se očekává, že budou letální, by neměly být podávány. Také není nutné podávat dávky, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající pokusná zvířata nebo pokusná zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při interpretaci výsledků jsou hodnocena jako pokusná zvířata uhynulá při zkoušce^{7a)}.

Metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařazení a klasifikaci látky podle globálně harmonizovaného systému (GHS) klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu^{7a)}.

Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledky jiných zkoušek toxicity dané látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: vztahuje se na nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 h.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Skupině pokusných zvířat stejného pohlaví se postupně podá fixní dávka 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výjimečně lze uvažovat o další fixní dávce 5 000 mg/kg, viz část 1.6.2). Výchozí úroveň dávky se zvolí na základě orientační studie jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá některé příznaky toxicity, aniž způsobí závažné toxické účinky nebo úhyn^{7a)}. Dalším skupinám pokusných zvířat může být podána vyšší nebo nižší dávka podle přítomnosti nebo nepřítomnosti příznaků toxicity nebo uhynutí. Podle tohoto postupu se pokračuje, dokud dávka nevyvolá zřejmou toxicitu nebo není pozorováno více než jedno uhynutí, anebo pokud nejsou při nejvyšší dávce zjištěny žádné účinky nebo pokud dochází k úhynům při nejnižší dávce.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Výběr druhu pokusných zvířat

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice^{7a)}. Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD₅₀ ukazuje, že mezi pohlavími je obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, ale v případech, v nichž jsou rozdíly pozorovány, jsou samice obecně nepatrně citlivější^{7a)}. Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá pokusná zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé pokusné zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 týdnů staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu $\pm 20\%$ střední hmotnosti pokusných zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$. Ačkoliv by relativní vlhkost měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.3 Příprava pokusných zvířat

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾.

1.4.4 Příprava dávek

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný konečný produkt nebo směs, může však mít použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, větší závažnost pro hodnocení následného rizika této látky. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by

objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml/100 g tělesné hmotnosti: avšak u vodných roztoků připadá v úvahu dávka 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodného roztoku/suspenze/emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy jejich toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP

1.5.1 Podávání dávek

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační rourky. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze dávku podat po menších množstvích během nejvýše 24 h.

Před podáním zkoušené látky nemají pokusná zvířata dostávat krmivo (např. potkanům by se nemělo podávat přes noc, myším 3 – 4 h), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se pokusná zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu ke krmivu na další 3 – 4 h u potkanů nebo 1 – 2 h u myší. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout pokusným zvířatům krmivo a vodu.

1.5.2 Orientační studie

Cílem orientační studie je umožnit výběr vhodné výchozí dávky pro hlavní studii. Zkoušená látka se podává jednotlivým zvířatům postupně podle vývojového diagramu v tabulce 1. Orientační studie je ukončena, jakmile lze stanovit výchozí dávku pro hlavní studii (nebo pokud je při nejnižší fixní dávce pozorován úhyn).

Výchozí dávka orientační studie se zvolí z fixních úrovní dávek 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá zřejmou toxicitu, přičemž toto očekávání je pokud možno založeno na důkazech z údajů získaných *in vivo* a *in vitro* ze stejné chemické látky a ze strukturně příbuzných látek. Pokud takové informace neexistují, výchozí dávka činí 300 mg/kg.

Před podáním dávky každému dalšímu pokusnému zvířeti se ponechá doba minimálně 24 h. Všechna pokusná zvířata se pozorují minimálně 14 dnů.

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg (viz tabulka 3). S ohledem na dobré zacházení s pokusnými zvířaty se pokusy na pokusných zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000 – 5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud

existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takového pokusu mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví pokusných zvířat nebo životního prostředí.

V případech, kdy pokusné zvíře, u něhož je látka zkoušena v nejnižší fixní úrovni dávky (5 mg/kg), v orientační studii uhyne, obvykle se studie ukončí a látka přiřadí do kategorie 1 GHS (jak je uvedeno v tabulce 1). Pokud je však vyžadováno další potvrzení klasifikace, může být proveden tento volitelný doplňkový postup: druhému pokusnému zvířeti se podá dávka 5 mg/kg. Pokud toto druhé pokusné zvíře uhyne, bude kategorie 1 GHS potvrzena a studie okamžitě ukončena. Pokud druhé pokusné zvíře přežije, dávka 5 mg/kg se podá maximálně třem dalším pokusným zvířatům. Jelikož riziko úhynu bude vysoké, měla by být látka pokusným zvířatům podávána postupně, aby bylo zajištěno dobré zacházení s pokusnými zvířaty. Časový interval mezi dávkami podanými jednotlivým pokusným zvířatům by měl být dostatečný na to, aby bylo možné stanovit, zda pokusné zvíře, jemuž byla látka podána dříve, pravděpodobně přežije. Pokud dojde k úhynu druhého pokusného zvířete, posloupnost podávání se okamžitě ukončí a látka nebude podána žádnému dalšímu pokusnému zvířeti. Vzhledem k tomu, že výskyt druhého úhynu (bez ohledu na počet pokusných zvířat, na nichž byla látka v době ukončení zkoušena) spadá do výsledku A (2 anebo více úhynů), postupuje se podle pravidla klasifikace v tabulce 2 s fixní dávkou 5 mg/kg (kategorie 1, pokud se vyskytnou dva a více úhynů nebo kategorie 2, pokud se nevyskytne více než 1 úhyn). Navíc je v tabulce 4 uvedeno poučení týkající se klasifikace v rámci systému EU, dokud nebude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

1.5.3 **Hlavní studie**

1.5.3.1 *Počet pokusných zvířat a úrovně dávek*

Kroky, podle kterých se má postupovat po provedení zkoušek s výchozí úrovní dávky, jsou uvedeny ve vývojovém diagramu v tabulce 2. Bude nutné zvolit jeden ze tří postupů: buď zkoušení ukončit a stanovit odpovídající klasifikační třídu nebezpečnosti, provést zkoušky s vyšší fixní dávkou nebo zkoušky s nižší fixní dávkou. Avšak s ohledem na ochranu pokusných zvířat se v hlavní studii znovu nepoužije úroveň dávky, která v orientační studii vedla k uhynutí (viz tabulka 2). Zkušenosti ukázaly, že nejpravděpodobnějším výsledkem u výchozí úrovně dávky bude, že látku lze klasifikovat bez nutnosti dalších zkoušek.

Obvykle se pro každou vyšetřovanou úroveň dávky použije celkem pět pokusných zvířat stejného pohlaví. Mezi těmito pěti pokusnými zvířaty bude jedno pokusné zvíře z orientační studie, jemuž byla podána zvolená úroveň dávky, a další čtyři pokusná zvířata (kromě výjimečných případů, kdy úroveň dávky použité v hlavní studii nebyla součástí orientační studie).

Časový interval mezi podáváním každé úrovně dávky závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Expozice pokusných zvířat

další dávce by měla být odložena, dokud nebude jisté, že pokusná zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila. Mezi jednotlivými úrovněmi dávky se v případě potřeby doporučuje ponechat dobu 3 nebo 4 dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné reakce.

Při zvažování použití nejvyšší fixní dávky 5 000 mg/kg se postupuje podle metody popsané v tabulce 3 (viz také část 1.6.2).

1.5.3.2 *Limitní zkouška*

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo prostředcích s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, by měla být provedena hlavní zkouška.

Podle obvyklého postupu slouží jako limitní zkouška pro tyto pokyny výchozí dávka orientační studie 2 000 mg/kg (nebo výjimečně 5 000 mg/kg), po níž následuje podání této úrovně dávky dalším čtyřem pokusným zvířatům.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se pokusná zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 h, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 h, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné pokusná zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit kvůli dodržování pravidla dobrého zacházení s pokusnými zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity^{7a)}. Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé pokusné zvíře jednotlivě.

Další pozorování budou nutná, jestliže pokusná zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu^{7a)}. Pokusná zvířata ve stavu agónie a pokusná zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou pokusná zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 **Tělesná hmotnost**

Hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti. Na konci zkoušky se pokusná zvířata, která přežila, zváží a poté humánně utratí.

1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata se pitvají. U každého pokusného zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážít mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické změny.

2 **DATA**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé pokusné zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých pokusných zvířat, počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet pokusných zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých pokusných zvířat, popis a časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),
- identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (v případě potřeby):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- mikrobiologický stav pokusných zvířat, je-li znám,
- počet, stáří a pohlaví pokusných zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),

— původ, podmínky chovu, krmivo atd.

Zkušební podmínky:

— podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,

— podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně podávaných objemů a době podávání,

— podrobné údaje o krmivu a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje krmiva, zdroje vody),

— zdůvodnění výběru výchozí dávky.

Výsledky:

— tabulky údajů o reakcích každého pokusného zvířete a o jeho úrovni dávky (tj. počet pokusných zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků),

— tabulky údajů o tělesné hmotnosti a jejích změnách,

— individuální hmotnosti pokusných zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,

— datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,

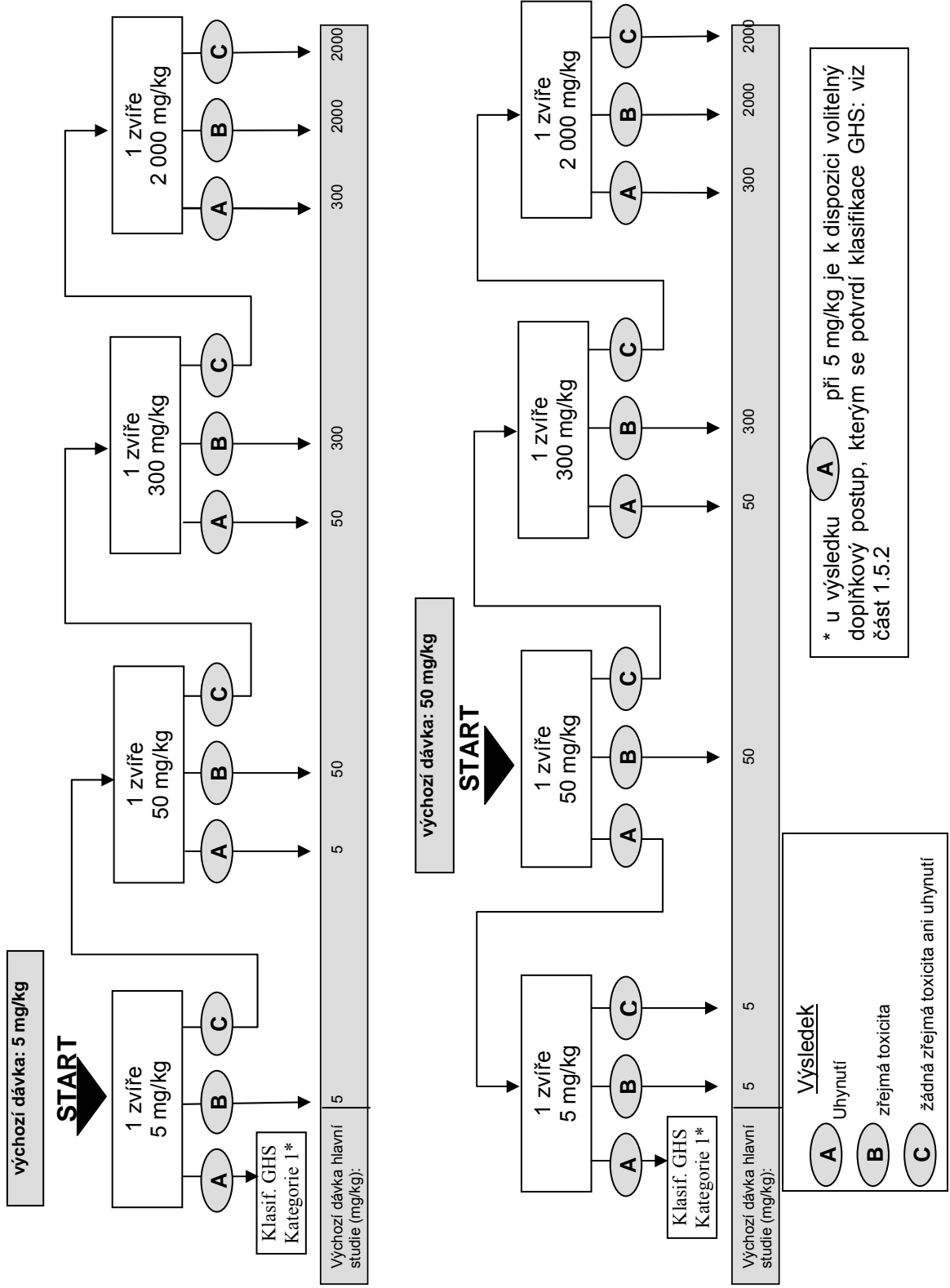
— časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého pokusného zvířete a zda byly vratné,

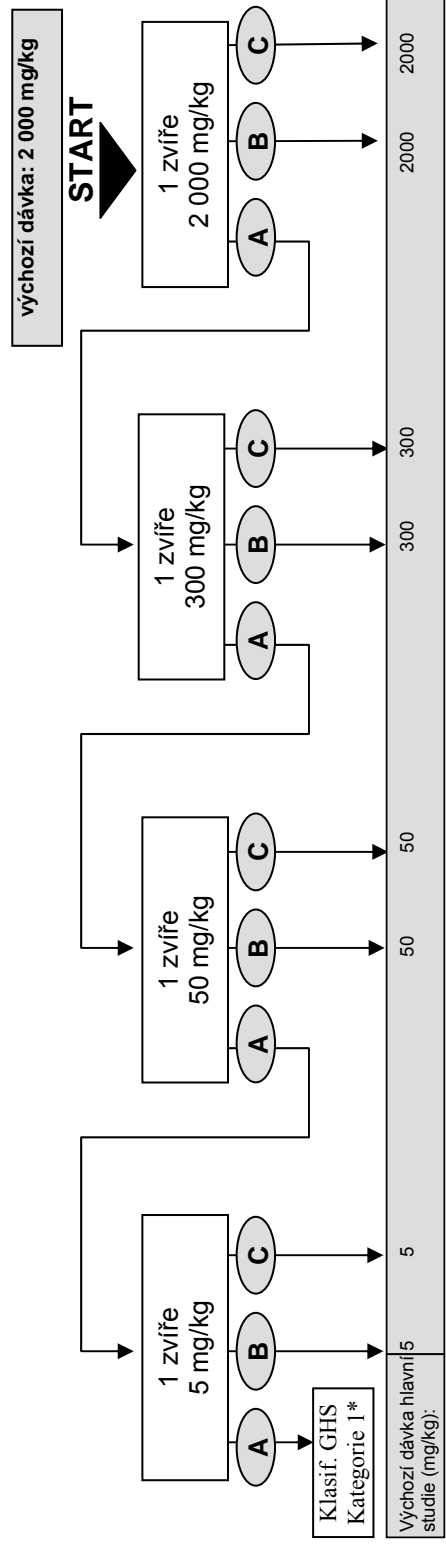
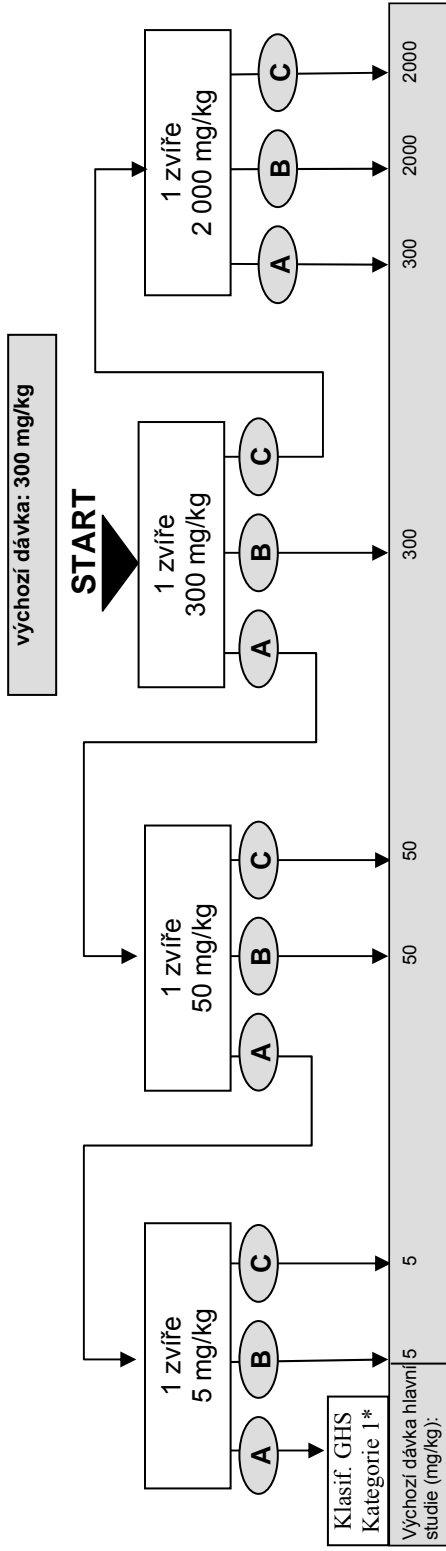
— pitevni a histopatologické nálezy pro každé pokusné zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

Tabulka 1: VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO ORIENTAČNÍ STUDII





Výsledek

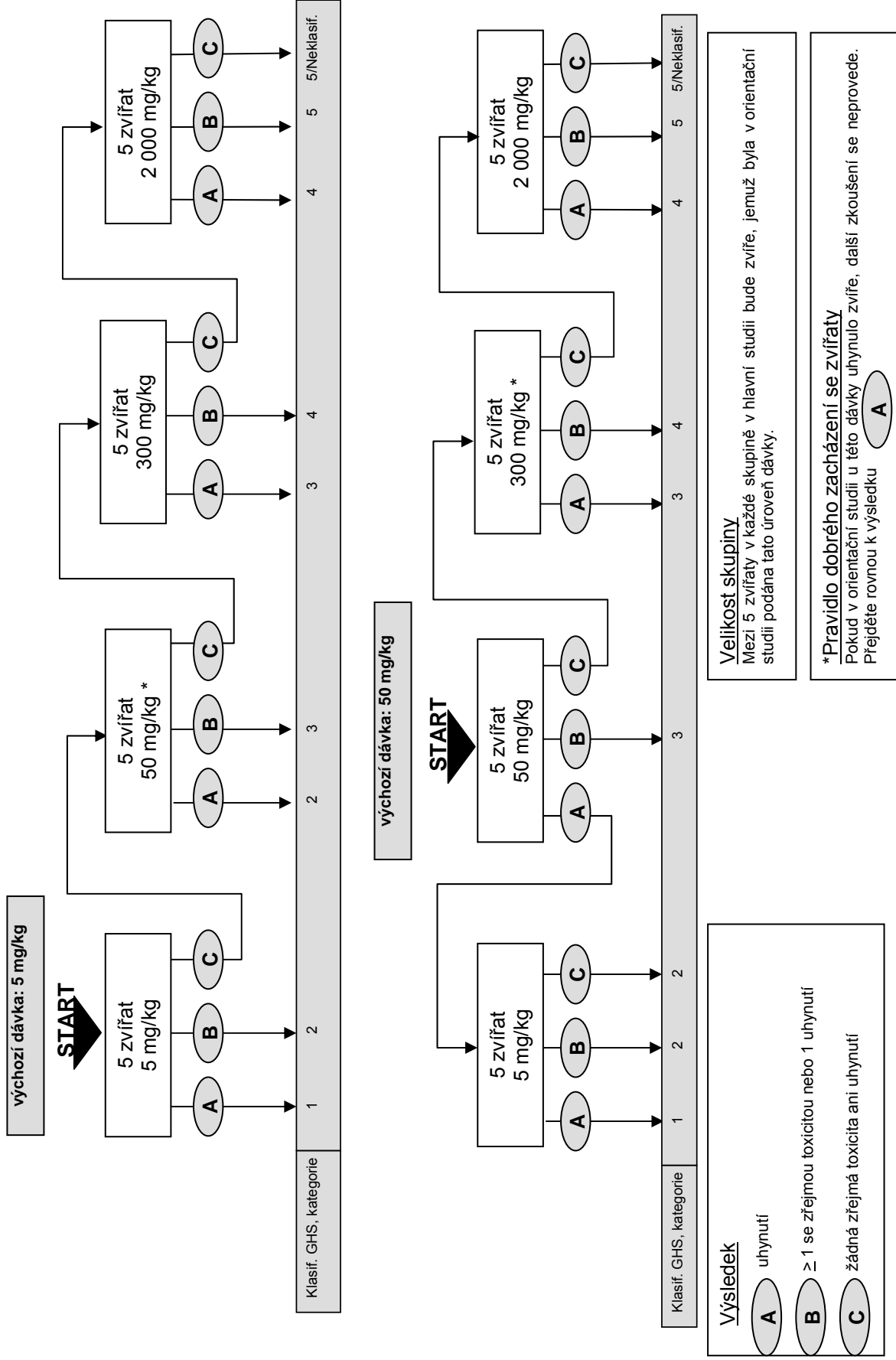
A uhynutí

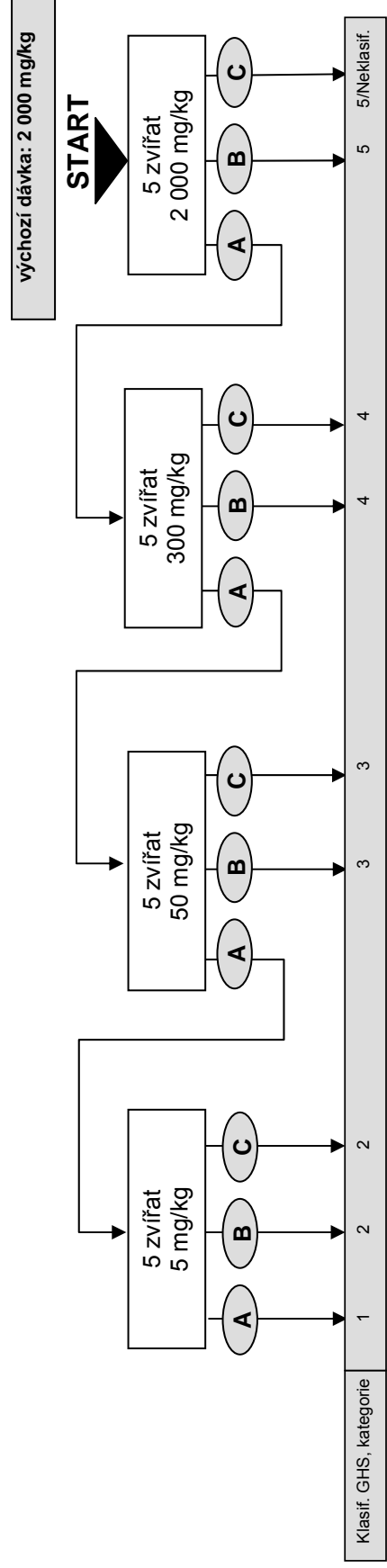
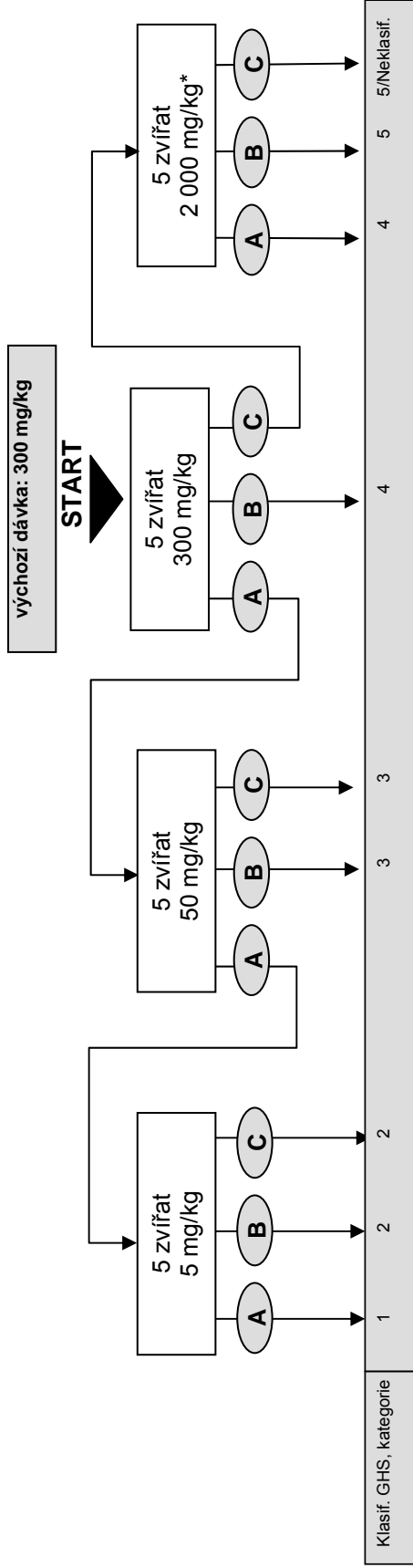
B zřejmá toxicita

C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

*u výsledku **A** při 5 mg/kg je k dispozici volitelný doplňkový postup, kterým se potvrdí klasifikace GHS: viz část 1.5.2

Tabulka 2: VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO HLAVNÍ STUDII





Výsledek

A ≥ 2 uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí

C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvířte, jemuž byla v orientační studii podána tato úroveň dávky.

***Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty**
Pokud v orientační studii u této dávky uhynulo zvířte, další zkoušení se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku **A**

Tabulka 3

KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD₅₀ PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 mg/kg BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD₅₀ nebo LD₅₀ ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušené látky lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (v GHS kategorii 5) v těchto případech:

- a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze systémů zkoušení uvedeného v tabulce 2, v závislosti na výskytech uhynutí,
- b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD₅₀ se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na pokusných zvířatech nebo z toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví,
- c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno, a
 - pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující významné toxické účinky na člověka, nebo
 - pokud je během zkoušení orální cestou do hodnot kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování do hodnot kategorie 4 s výjimkou průjmu, piloerekce nebo rozcuchané srsti, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují potenciál pro významné akutní účinky vyplývající z jiných studií na pokusných zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 mg/kg

Ve výjimečných případech, a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně fixní dávky 5 000 mg/kg. S ohledem na potřebu ochrany dobrého zacházení s pokusnými zvířaty se zkoušení v dávkách 5 000 mg/kg nedoporučuje a mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky by měly přímý význam pro ochranu pokusných zvířat nebo lidského zdraví^{7a)}.

Orientační studie

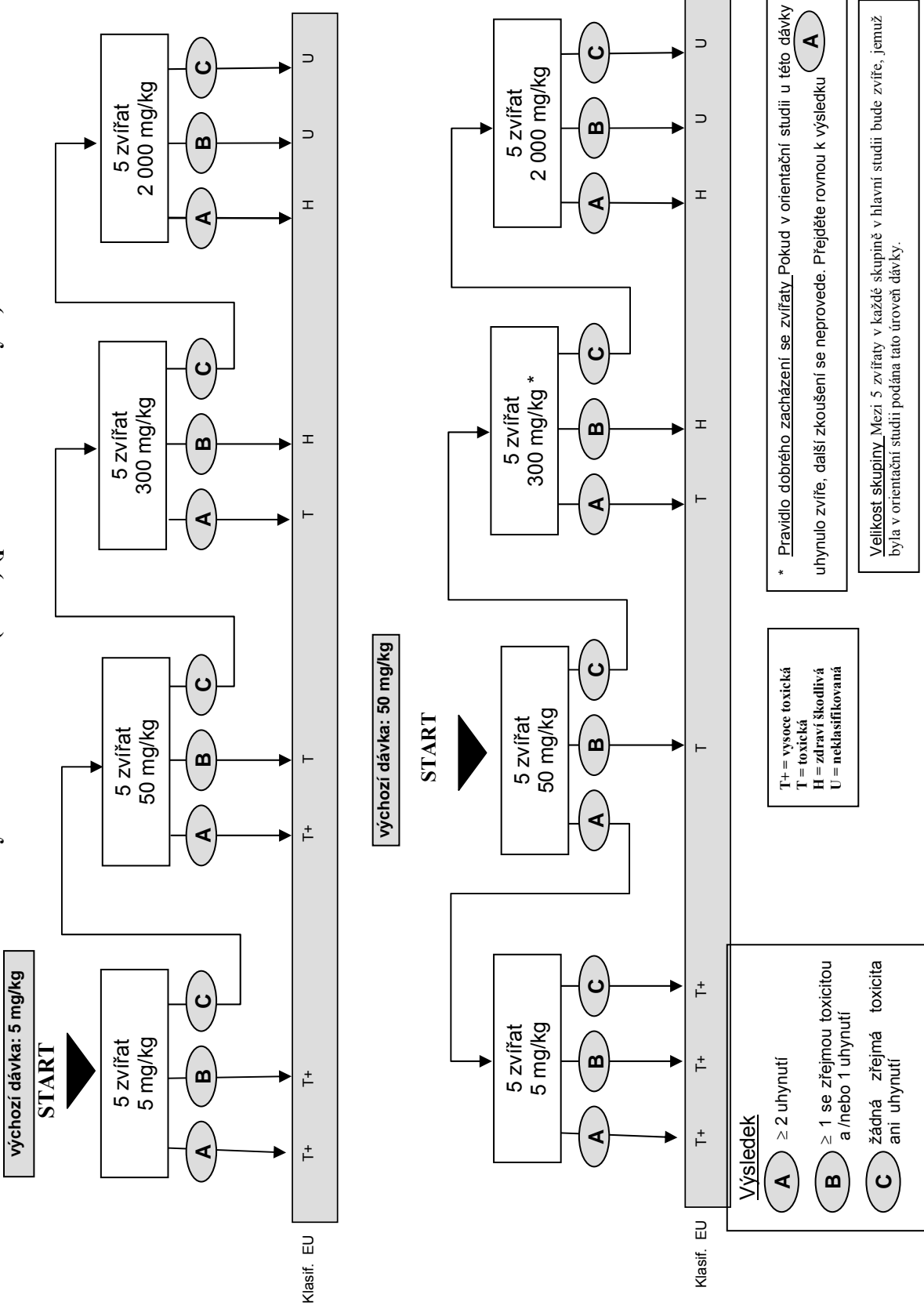
Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v tabulce 1, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se v orientační studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, výsledek A (úhyn) povede k nutnosti zkoušet na druhém pokusném zvířeti dávku 2 000 mg/kg. Výsledky B a C (zřejmá toxicita nebo žádná toxicita) umožní zvolit dávku 5 000 mg/kg za výchozí dávku hlavní studie. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledky B nebo C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg bude vyžadovat výchozí dávku hlavní studie 2 000 mg/kg a výsledky B a C budou vyžadovat výchozí dávku v hlavní studii 5 000 mg/kg.

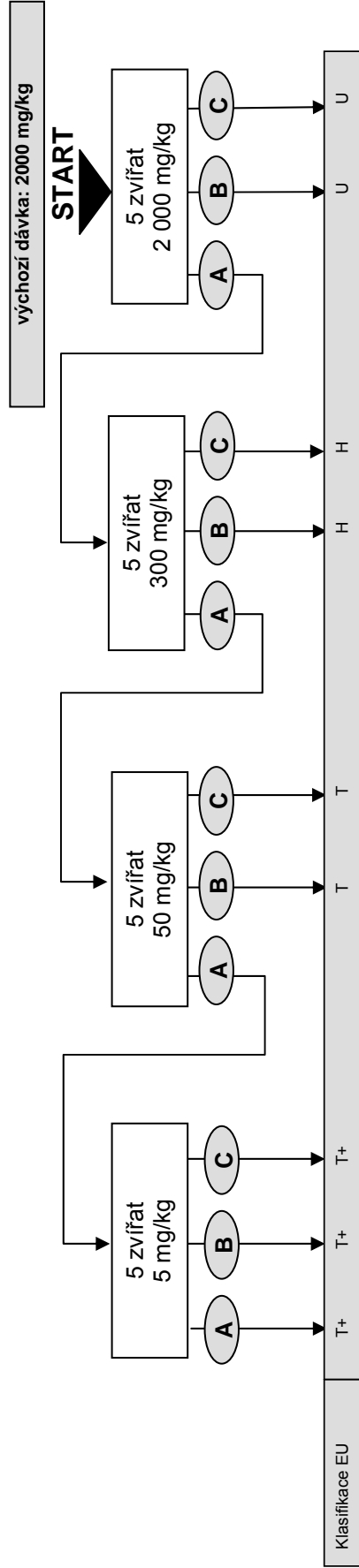
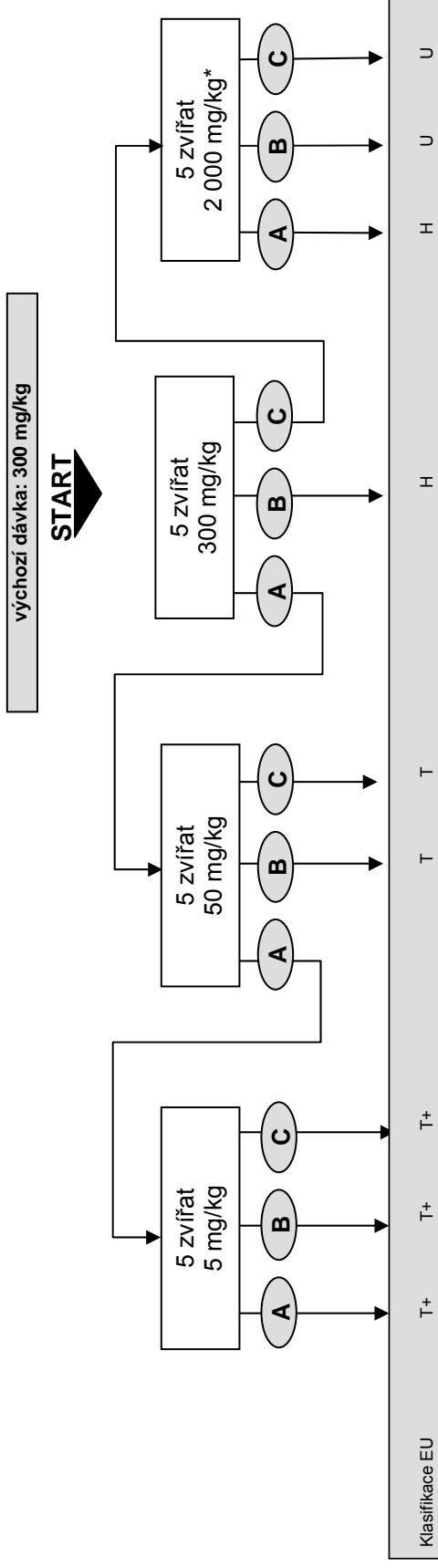
Hlavní studie

Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v tabulce 2, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se tedy v hlavní studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, bude výsledek A (≥ 2 úhyny) vyžadovat zkoušení dávky 2 000 mg/kg na druhé skupině. Výsledek B (zřejmá toxicita nebo ≤ 1 úhyn) nebo C (žádná toxicita) povedou k tomu, že látka nebude podle GHS klasifikována. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledek C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg povede k tomu, že se látka přiřadí do kategorie 5 GHS a na základě výsledku B nebo C látka nebude klasifikována.

Tabulka 4

ZKUŠEBNÍ METODA B.1 bis – Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury^{7(a)})





Výsledek

A ≥ 2 uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí

C žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

Velikost skupiny
Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvířte, jemuž byla v orientační studii podána tato úroveň dávky.

***Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty**
Pokud v orientační studii u této dávky uhynulo zvířte, další zkoušení se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku **A**