

## ZKOUŠENÍ BEZPEČNOSTI

### 1. Zkoušení na cílových zvířatech

#### 1.1. Toxikologické zkoušení

Testy tolerance se provádějí tak, že se zkouší biologické, toxikologické a histologické účinky zkoušené doplňkové látky, premixu nebo krmiva. Určuje se faktor bezpečnosti, což je rozdíl mezi navrhovaným nejvyšším dávkováním a dávkou, při které nastupují škodlivé efekty. Je-li zjištěno, že dávka se škodlivými následky leží daleko za hranicemi navrhovaného nejvyššího dávkování, tento koeficient se stanovuje velmi nízký nebo postačí jen řádové určení.

#### 1.2. Mikrobiologické zkoušení

1.2.1. Je-li účinná látka chemicky specifikovatelná a vykazuje-li antimikrobiální aktivitu v koncentrovaných krmivech, provádí se studie na stanovení antimikrobiálního spektra účinnosti účinné látky při určení minimální inhibiční koncentrace u různých patogenních a nepatogenních grampozitivních a gramnegativních druhů bakterií.

1.2.2. Zkoušení k určení křížové rezistence proti léčebným antibiotikům stanovením minimální koncentrace inhibitorů na mutantech produkovaných in vitro a chromozomálně rezistentních na doplňkovou látku.

V případě mikroorganismů rezistentních k léčebným antibiotikům se určuje genetický základ této rezistence.

1.2.3. Zkoušky ke stanovení schopnosti doplňkové látky obsahovat rezistenční selekční faktor. Tyto zkoušky se provádí za provozních podmínek na tom druhu zvířat, pro který je doplňková látka určena. Poté se zkouší, zda nesou nalezené rezistenční selekční faktory vícenásobnou rezistenci a zda jsou přenosné.

1.2.4. Zkoušky ke stanovení působení doplňkové látky :

- na normální střevní floru,
- na kolonizaci trávicího traktu, jedná-li se o mikroorganismy nebo směs některých rodů mikroorganismů,
- na vylučování exkrecí patogenních mikroorganismů, je-li látka chemicky specifikovatelná a má antimikrobiální aktivitu.

1.2.5. V případě, že doplňková látka vykazuje antimikrobiální aktivitu: zkoušky ke stanovení procentuálního podílu bakterií rezistentních na doplňkovou látku v běžných podmínkách. Tato zkoušení se provádí ve větších časových odstupech před, během a 1 měsíc po nasazení doplňkové látky.

1.2.6. Je-li účinná látka mikroorganismus, určuje se, zda je rezistentní na antibiotika.

1.2.7. Je-li účinná látka vyráběna z mikroorganismů (např. enzymové preparáty) určuje se úroveň jednotlivých životaschopných mikroorganismů.

1.2.8. Jedná-li se o mikroorganismy, předkládají se tyto informace:

- o použití geneticky modifikovatelných mikroorganismů ve výzkumu,
- kompletní technická dokumentace o užití včetně dopadu na ekosystém, rizik pro zdraví lidí a zvířat,
- podmínky pro uvedení do oběhu, včetně označování a balení.

1.3. Zkoušení a stanovení látkové výměny a reziduí účinné látky

1.3.1. Zkoušení bilanční látkové výměny. Vyloučená dávka účinné látky v moči a výkalech, vyloučená dechem, rezidua v organismu.

1.3.2. Zjišťování látkové výměny : absorpce, rozdělení, biotransformace, vylučování. Eventuálně údaje o vylučování žluči z hepatoenterálního cyklu a ze zažívacího traktu.

1.3.3. Analytické stanovení reziduí: kvalitativní a kvantitativní složení reziduí (účinná látka, metabolity) v různých orgánech a tkáních zvířat, rovněž tak ve vyprodukovaných živočišných produktech po vyrovnání látkové výměny a za praktických podmínek užití doplňkové látky .

1.3.4. Farmako - kinetická zkoušení reziduí (po opakovaném podávání doplňkové látky za navržených podmínek používání), persistence účinné látky a hlavních metabolitů v různých orgánech a tkáních po vysazení krmiva obsahujícího doplňkovou látku.

1.3.5. Zkoušení biologické pohotovosti reziduí ve tkáních a produktech cílových druhů zvířat (viz 3.8.).

1.3.6. Metody kontroly : popis kvalitativních a kvantitativních metod použitých pro stanovení v bodech 1.3.1. až 1.3.5. s údaji o použité dávce, specifitě a důkazové cestě. Metody k důkazu reziduí musí být tak přesné, aby byla dokazatelná taková množství reziduí, která jsou toxikologicky nezávadná.

## **2. Zkoušení vyloučených reziduí**

- 2.1. Druh a koncentrace reziduí účinné látky včetně metabolitů v exkrementech.
- 2.2. Persistence (poločas rozpadu) a kinetika eliminace v hnoji, kejďě, slámě.
- 2.3 Účinky na tvorbu metanu.
- 2.4. Odbourávání, persistence (poločas rozpadu) v půdě (různé půdní typy).
- 2.5 Účinek na půdní faunu a mikrobiální procesy transformace (odbourávání rostlinných a živočišných reziduí, dusíková výměna a jiné).
- 2.6. Účinek na rostliny (osivo - klíčivost, růst rostlin, příjem rostlinami atd.). Tyto zkoušky se provádí v uzavřeném prostoru i v provozních podmínkách na různých druzích rostlin.
- 2.7. Rozpustnost a stabilita produktů ve vodě (účinné látky, metabolitů) pocházejících z užití doplňkové látky (krmiva).
- 2.8. Účinek na vodní faunu a floru.
  - 2.8.1. Účinek na rostliny (např. rodu chlorella).
  - 2.8.2. Toxicita u bezobratlých (např. *Daphnia magna*).
  - 2.8.3. Toxicita u ryb (minimálně na dvou vybraných převládajících druzích, které žijí volně v oblasti).

## **3. Zkoušky na laboratorních zvířatech**

Tato zkoušení se provádějí s účinnou látkou a jejími hlavními metabolity, jestliže se vyskytují v získaném živočišném produktu a jsou biologicky využitelné. Pokusná zvířata se vybírají podle možností ta, u kterých se předpokládá, že doplňková látka bude metabolizovat obdobně jako u lidí. Je nutný úplný popis provedených pokusů, druh a původ použitých zvířat, velikost a počty kontrolních skupin, použité dávky, složení krmné dávky, výsledky analýz krmiva, podmínky chovu, přesná délka trvání pokusů, časový bod různých provedených zásahů, mortalita.

Dokumentace obsahuje všechna makroskopická, mikroskopická a histopatologická zjištění, pozorovaná na pokusných zvířatech, s udáním časového bodu nástupu patologických příznaků. Z provedených zkoušek se předkládají podrobně zpracované výsledky včetně statistického vyhodnocení.

### 3.1. Akutní toxicita

3.1.1. Akutní orální zkoušky na toxicitu se provádí na dvou druzích zvířat (jako jeden z nich je doporučován potkan). Maximální dávkování by nemělo překročit 2000 mg na 1 kg živé hmotnosti. Detailní záznamy o pozorovaných biologických efektech během minimálně dvou týdnů po aplikaci budou k dispozici. Tyto studie nejsou nutné pro enzymové preparáty.

3.1.2. Akutní toxicita při vdechování, účinek na pokožku a je-li potřebné na sliznice, rovněž tak alergický potenciál se zjišťují ve zkouškách, které umožní určení možných nebezpečí pro užití doplňkové látky.

### 3.2. Mutagenita

#### 3.2.1. Pro chemicky specifikovatelné doplňkové látky

Pro identifikaci mutagenních vlastností účinné látky nebo jejích metabolitů se provádí vybrané kombinace zkoušek na stanovení mutagenity. Tyto zkoušky jsou založeny na různých genetických základech. Testy se provádí za přítomnosti a nepřítomnosti mikrosomálních savčích preparátů pro metabolickou aktivaci.

Doporučuje se následující kombinace testů :

- zkouška genové mutace v prokariotickém systému,
- zkouška genové mutace v in vitro eukariotickém systému nebo na pohlaví vázaný recesivní letální faktor s *Drosophila melanogaster*,
- in vitro a in vivo zkoušky na stanovení chromozomálního poškození.

Ve všech případech se výběr zkoušek zdůvodní. Stanoví se vhodné zkoušky, které se provedou podle platných zásad. Záleží na získaných výsledcích a celkovém profilu toxicity látky, stejně tak jako na jejím užití, zda je nutno provést dodatečné zkoušky.

3.2.2. V případě enzymových preparátů odvozených z mikroorganismů se vyžadují následující testy:

- zkouška genové mutace bakterií,
- test chromozomální aberace (přednostně in vitro).

Toxikologické testy se provádějí s použitím fermentačního preparátu konečné čistoty, před přidáním nosičů, ředidel nebo dalších substancí. Základním pravidlem je, že se provádí v souladu s pravidly stanovenými uznávanými mezinárodními instituty. Vzhledem k projevujícím se efektům na

buněčné úrovni u látek proteinové povahy nebo enzymatické aktivity některých enzymových preparátů se připouští některé modifikace ve standardním protokolu ,částečně i u testů in vitro.Odlišnosti se akceptují pokud jsou podpořeny argumenty.

Testovací systém je koncipován tak,aby odhalil nespecifické toxické reakce a genotoxické efekty. Kombinovaná informace ze všeobecné specifikace a tento rozšiřující test dávají možnost využít preparát pro zjištění přítomnosti obou specifických toxinů a neznámých toxických složek.

Toxikologická zpráva obsahuje dostatečnou dokumentaci , testy se provádí na materiálu,který tvoří základ konečného obchodního výrobku tak,jak je popsáno v technické dokumentaci.

### 3.3 . Metabolické a farmakokinetické aspekty.

Jedná-li se o účinné látky,které jsou chemicky stanovitelné, bilanční zkoušky a rovněž tak určení metabolitů se provádí pomocí pro tyto účely odpovídajících označených molekul jedné nebo více dávek účinné látky ve vhodném čase. Zkoušky látkové výměny zahrnují zkoušky o farmakokinetice účinné látky a jejich hlavních metabolitů. Při výběru dalších toxikologických zkoušek na relevantních druzích zvířat se zohledňují rozdíly v metabolismu účinné látky u různých druhů zvířat.

### 3.4. Subchronická toxicita

Většinou se tyto zkoušky provádí na 2 druzích zvířat (jedním jsou přednostně potkani, druhým pak cílový druh zvířat).

Zkoušená látka se podává orálně, tím se stanoví vztah dávka - účinek. Délka zkoušky je u hlodavců minimálně 90 dní. V určitých případech se provádějí zkoušky od 6 měsíců do 2 let na psech nebo jiných nehlodavcích pro určení citlivosti různých druhů zvířat ve vztahu k testované látce.

Tato zkouška se neprovádí u mikroorganismů.Jedná-li se o enzymové preparáty pocházející z mikroorganismů, je dostačující 90denní orální test na hlodavcích.

### 3.5. Chronická toxicita/karcinogenita

Dlouhodobé zkoušky chronické toxicity se provádí na hlodavcích (přednostně potkanech), zkoušky karcinogenity na 2 druzích hlodavců (přednostně na potkanech). Zkoušená substance je podávána orálně v různých dávkách.Provádí se rovněž kombinované zkoušky na dlouhodobou toxicitu/karcinogenitu s prenatalní expozicí .Délka zkoušky je minimálně 2 roky u potkanů a 18 týdnů u myší. Když řada pokusů překročí minimální časovou délku trvání, ukončí se, jakmile počet zvířat, který přežije v každé skupině, s výjimkou skupiny s nejvyšší dávkou, klesne na 20 kusů ze

sta. Plné klinicko–chemické, hematologické zkoušky a zkoušky moči se provádí s vhodným časovým odstupem během celého trvání pokusu. Makroskopické a histologické zkoušky se provádí během testu a u zvířat, která na konci přežila pokus.

### 3.6. Zkoušky účinku na reprodukci

Provádí se na potkanech. Provádí se minimálně po 2 generace v přímých liniích původu a v souvislosti se zkouškami na embryonální toxicitu, eventuelně teratogenitu. Všechny relevantní parametry plodnosti, březosti a vrhu stejně jako pre- a postnatální situace se pečlivě pozorují a popisují. Specifické zkoušky teratogenity se provádí minimálně na 2 druzích zvířat.

### 3.7. Toxikologie metabolitů

Podklady pro výpočet koncentrace reziduí se požadují jako základ pro odhad rizika u lidí. Tyto podklady se předkládají pro výpočet ochranné lhůty doplňkové látky.

### 3.8. Ostatní relevantní zkoušky

Předkládá se každá další zkouška, která přináší jiné nezbytné údaje o účinné látce, popřípadě doplňkové látky nebo novém krmivu.