

Část I.

Biologické zkoušení určitých proteinových krmiv

Biologické zkoušení určitých proteinových krmiv zahrnuje provedení zkoušek uvedených v této příloze.

Zpracovaná dokumentace o výsledcích těchto zkoušek musí obsahovat přesné údaje, které musí být v předepsaném pořadí dle této přílohy očíslovány, a musí k nim být přiložen souhrn. Neuvedení některé zkoušky je nutno zdůvodnit. Publikace, na něž je odkazováno, je nutno doložit v předkládané dokumentaci. Ústav si může dodatečně vyžádat další podklady.

V této příloze se pojem produkt vztahuje na jakýkoli proteinový produkt ve stavu, v jakém by měl být použit jako samostatná surovina nebo jako součást krmiva.

Každá změna výrobního postupu produktu nebo každá změna jako použití podléhá ohlášení, na jehož základě může ústav požadovat předložení podkladů, které umožní nové posouzení.

1. Údaje o použitém mikroorganismu

1.1. Taxonomie, původ, morfologie, biologické vlastnosti, v daném případě genetické změny

1.2. Neškodnost, případná stálost mimo kultivační medium a případné účinky na životní prostředí

1.3. Stálost a stupeň čistoty kultivovaných kmenů mikroorganismů. Metody použitelné k ověření těchto znaků.

2. Kultivační media a výrobní postup

2.1. Složení substrátů, přidávaných látek atd.

2.2. Postupy výroby, sušení a čištění. Postup devitalisace mikroorganismů. Metody použitelné k ověření stálosti složení krmiva vyrobeného kultivací mikroorganismů a ke stanovení případných chemických, fyzikálních nebo biologických nečistot v průběhu výroby

2.3. Technický postup úpravy pro použití.

3.

Znaky produktu

3.1. Fyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti: makro- a mikroskopická morfologie, velikost částic, hustota, specifická hmotnost, vazba vody, rozpustnost, elektrostatické vlastnosti atd.

3.2. Chemické složení a znaky

3.2.1. Vlhkost, obsah dusíkatých látek, tuku, vlákniny, popela, veškerých cukrů jako sacharosa. Kolísání rozpětí obsahů.

3.2.2. Obsah celkového dusíku, bílkovin, nukleových kyselin, amoniakálního dusíku, aminového dusíku, nitrátů a nitritů. Kvalitativní a kvantitativní složení aminokyselin celkem a volných aminokyselin a rovněž purinových a pyrimidinových bází.

3.2.3. Kvalitativní a kvantitativní složení tuků (mastné kyseliny, nezmýdelnitelné látky, pigmenty rozpustné v tuku, fosfolipidy).

3.2.4. Složení obsažených cukrů

3.2.5. Kvalitativní a kvantitativní složení obsahu minerálních složek.

3.2.6. Kvalitativní a kvantitativní složení obsahu vitamínů.

3.2.7. Kvalitativní a kvantitativní složení obsahu speciálních složek: doplňkové látky, zbytky substrátů a zředňovacích prostředků, jiné případně škodlivé zbytky látkové přeměny substrátu, kultivačního media, výrobního postupu.

3.3. Mikrobiologická kontaminace výrobku

3.4. Chování a stabilita produktu ve směsi s jinými krmivými složkami při skladování.

4.

Úprava a podmínky pro použití

4.1. Navržený název produktu pro uvádění do oběhu

4.2. Úprava produktu navrhovaná pro uvádění do oběhu

4.3. Předpokládané užití produktu ve výživě zvířat. Navržené koncentrace v kompletní krmné směsi a navržené množství krmiva v denní krmné dávce pro uvažované druhy a kategorie zvířat.

5.

Kontrolní metody

Kvalitativní a kvantitativní analytické metody ke kontrole produktu v kompletních krmných směsích a premixech.

Popis těchto metod musí být doplněn následujícími údaji: zvláštnost, citlivost, hranice důkazu, rozpětí chyby a případné interference s jinými látkami. Vzorčky výrobku v různých předpokládaných úpravách musí být k dispozici.

6.

Ověření výživářsko-fyziologických vlastností výrobku

6.1. Určení hodnoty bílkoviny

6.1.1. Chemické, biochemické a mikrobiologické zkoušky.

6.1.2. Zkoušky produktu na laboratorních zvířatech ve srovnání s kontrolní bílkovinou.

6.2. Zkoušky produktu provedené na druzích a kategoriích zvířat, pro něž je určen jako krmivo. Na každém druhu a kategorii zvířat, u něhož je předpoklad užití produktu, musí být provedeny následující zkoušky ve srovnání s kontrolní skupinou, která je krmena obvyklým krmivem s ekvivalentním podílem dusíkatých látek bílkovinné povahy - u přežvýkavců ekvivalentním podílem celkového dusíku za naprosto stejných podmínek výživářsko-fyziologické srovnatelnosti.

6.2.1. Stanovení hodnoty bílkovin a hodnoty energie přidávaného produktu v krmné dávce v navržených podmínkách použití a v různých fyziologických obdobích zvířat (např. růst, březost, snáška).

6.2.2. Stanovení vlivu produktu na růst (přírůstky), produkční účinnost, zdravotní stav, případné úhyny v navržených podmínkách užití.

6.2.3. Stanovení optimálního podílu produktu v krmné dávce.

6.2.4. Ověření působení produktu za navržených podmínek užití na technologické, organoleptické a ostatní kvalitativní vlastnosti živočišných produktů.

6.3. Pokusné podmínky pro zkoušení produktu na použitelnost u předpokládaných druhů a kategorií zvířat. Provedené pokusy je nutno zevrubně popsat s uvedením následujících podrobností.

6.3.1. Druh, plemeno, stáří a pohlaví zvířat a označení.

6.3.2. Počet pokusných a kontrolních skupin; počet zvířat v každé skupině (tento počet musí být dostatečný pro statistické vyhodnocení při použití vhodných statistických parametrů).

6.3.3. Procentický podíl produktu v krmné dávce, kvalitativní a kvantitativní složení krmné dávky a její analýza.

6.3.4. Místo pokusů, fyziologický a zdravotní stav zvířat a podmínky chovu podle obecně prováděné praxe.

6.3.5. Přesná doba trvání pokusů a datum zkoušek.

6.3.6. Vedlejší účinky v průběhu pokusů a časové označení jejich projevu.

7.

Ověření biologických vlivů použití produktu ve výživě zvířat

7.1. Ověření na kategoriích zvířat, která přicházejí v úvahu pro užití krmiva. Na každém druhu a kategorii zvířat, u něhož je předpoklad užití krmiva, se provádějí dále uvedené zkoušky ve srovnání s kontrolní skupinou, která je krmena obvyklým krmivem s ekvivalentním podílem dusíkatých látek bílkovinné povahy, u přežvýkavců ekvivalentním podílem celkového dusíku, za naprosto stejných srovnatelných výživářských a fyziologických podmínek.

7.1.1. Stanovení nejvyššího možného podílu produktu v denní krmné dávce bez projevu vedlejších účinků.

7.1.2. Stanovení možných účinků produktu na plodnost a provedení generačních pokusů, pokud je pro jejich provedení důvod.

7.1.3. Stanovení účinků v navržených praktických podmínkách použití na mikroorganismy trávicího traktu, vliv na přítomnost pathogenních mikroorganismů v trávicím traktu.

7.1.4. Stanovení možných reziduí produktu (substrátu, kultivačního media, rozpouštědel, kontaminantů) za navržených podmínek užití v živočišných produktech.

7.1.5. Stanovení možných reziduí produktu (substrátu, kultivačního media, rozpouštědel, kontaminantů) za navržených podmínek užití v exkrementech.

7.2. Ověření produktu na laboratorních zvířatech

7.2.1. Chování produktu v organismu, sledování metabolismu, tj. (absorpce, akumulace, biologická přeměna, vylučování atd.).

7.2.2. Ověření možné mutagenity vyvolané kontaminanty (zejména mykotoxiny a bakteriemi) nebo rezidui produktu (substrátu, kultivačního media, rozpouštědla), včetně pokusů in vitro s aktivací výměny látkové.

7.2.3. Toxikologické zkoušky. Dále uvedené zkoušky produktu se provádějí ve srovnání s kontrolními skupinami, kterým jsou podávána obvyklá krmiva s ekvivalentními podíly dusíkatých látek bílkovinné povahy za naprosto stejných a srovnatelných výživářských a fyziologických podmínek. Zjištěné toxické účinky musí být prozkoumány, aby byla zdůvodněna jejich příčina a průběh, a aby se zejména zjistilo, zda pocházejí z výživářsko-fyziologické nevyváženosti nebo předávkování zkoušeného produktu.

7.2.3.1. Zkouška krátkodobé toxicity (minimálně 90 dní). Všeobecně se tyto zkoušky provádějí na dvou druzích zvířat, z nichž jeden jsou hlodavci. Produkt se podává v denní dávce v minimálně dvou různých hladinách. Tyto se volí tak, aby alespoň jedna dávka se uváděla jako bez účinku a jedna jako škodlivě se projevující. Skupiny zvířat jsou složeny z určeného počtu zvířat každého pohlaví. Vždy je zastoupena kontrolní skupina zvířat. V určených intervalech se zaznamenávají všechny rozhodující biologické údaje, zejména růstová křivka zvířat, spotřeba krmiva, hematologická

vyšetření, rozborů moče, biochemické parametry, úhyny, hmotnost orgánů, symptomy patologických účinků, histologické změny nejdůležitějších orgánů a tkání. Výsledky se zevrubně doloží a vyhodnotí statisticky.

7.2.3.2. Zkoušky dlouhodobé toxicity produktu. Všeobecně se tyto zkoušky provádějí na dvou druzích zvířat, z nichž jeden jsou hlodavci. Produkt se podává v denní dávce minimálně ve dvou různých hladinách. Pokusné období je minimálně dva roky u potkanů a nejméně 80 týdnů u myši. Skupiny zvířat jsou složeny z určeného počtu zvířat každého pohlaví. Vždy je zastoupena kontrolní skupina zvířat. V průběhu zkoušek na určení dlouhodobé toxicity v určených časových intervalech a rovněž na konci zkoušky na zvířatech, která přežila, se provádějí biologické zkoušky na stanovení krátkodobé toxicity přednostně na malé "satelitní" skupině zvířat (tj. oddělená, na hlavní skupině závislá skupina) viz 7.2.3.1).

7.2.3.3. Zkoušení karcinogenity krmiva. U zkoušek na karcinogenitu se stanoví časový mezník prvních příznaků u pokusných zvířat, histologické typy nádorů a jejich četnost. Účinky na četnost nádorů a nebo četnost na vývoj onemocnění, které by mohly být vyvolány zkoušeným produktem, se vyhodnotí proti kontrolní skupině zvířat podle bodu 7.2.3. Výsledky je třeba zevrubně doložit a vyhodnotit statisticky.

7.2.4. Speciální zkoušky produktu v generačních pokusech. Generační pokusy se vztahují minimálně na dvě generace zvířat v přímé linii spojeny se zkouškami na embryotoxicitu včetně teratogenity. Zvláštní pozornost se věnuje plodnosti a vrhům a jejich vývoji po narození. Lze předložit jinou metodu, která je vědecky doložena a dává měřitelné výsledky (např. Relais-toxicita).

7.2.5. Pokusné podmínky pro zkoušení produktu na laboratorních zvířatech se popisují s uvedením následujících podrobností.

7.2.5.1. Druh, plemeno a pohlaví zvířat.

7.2.5.2. Počet pokusných a kontrolních skupin, počet zvířat v každé skupině (dostatečný počet pro statistické vyhodnocení při použití vhodných statistických parametrů).

7.2.5.3. Procentický podíl krmiva v krmné dávce, kvalitativní a kvantitativní složení krmné dávky a její analýza.

7.2.5.4. Podmínky chovu v průběhu celé doby trvání zkoušek.

7.2.5.5. Přesná doba trvání zkoušek a datum zkoušek.

7.2.5.6. Příčiny a procenta úhynu v jednotlivých skupinách zvířat.

7.2.5.7. Klinické symptomy a patologické změny v průběhu zkoušek a časový mezník jejich projevu.

7.3. Ověření ve vztahu k životnímu prostředí - podle druhu zbytků produktu (substrát, kultivační médium, rozpouštědla, kontaminanty) ve výkalech krmených zvířat se požadují údaje o přetrvání těchto reziduí v hnoji, půdě a vodě, a o jejich účincích na půdní biologii, rostlinná společenstva a život ve vodě.

8.

Speciální účelová vyšetření

Podle druhu a podmínek použití produktu se požadují údaje o alergii, zánětech kůže, dráždění očních sliznic, dýchacích nebo trávicích cest a za účelem stanovení možných rizik při zacházení s produktem a pro zajištění preventivních opatření.

Biologické zkoušení doplňkových látek

Část II. A

Biologické zkoušení doplňkových látek jiných než mikroorganismy a enzymy

Biologické zkoušení doplňkových látek jiných než mikroorganismů a enzymů se řídí postupy uvedenými v části I.A. Mohou být požadovány všechny dále uváděné zkoušky a testy a je-li nutno i další informace.

Provedené zkoušky jsou podkladem pro zpracování dokumentace (tzv. dossier) o látkách a přípravcích, u kterých je nutno žádat o povolení jejich použití jakožto doplňkových látek do krmiv nebo o nové užití povolené doplňkové látky. V této části přílohy se termín "doplňková látka" týká účinných chemicky definovaných látek nebo přípravků obsahujících účinné látky ve stavu, v jakém budou zapracovány do premixů a krmiv. Dokumentace musí umožnit vyhodnocení doplňkových látek na základě současného stavu znalostí, které jsou předpokladem, že jejich povolení bude odpovídat stanoveným zásadám.

Pokud se dokumentace týká doplňkové látky pocházející nebo obsahující geneticky modifikované organismy ve smyslu zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů, musí být v dokumentaci uvedeny vedle informací požadovaných v této příloze též informace požadované nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003.

Dokument musí obsahovat podrobné zprávy o všech provedených zkouškách, předložené v pořadí a podle číslování uvedeného v této příloze. Musí obsahovat odkazy a kopie všech zveřejněných vědeckých údajů, týkajících se hodnocení doplňkové látky. Musí být dodána elektronická verze dokumentace. Závěrem zkoušek je objasnit, zda je užití doplňkové látky bezpečné:

- a) vzhledem k cílovým druhům zvířat v koncentracích navrhovaných v krmivech;
- b) vůči osobám, které mohou být vystaveny doplňkové látce vdechnutím, jiným kontaktem sliznic, očí nebo kůže při manipulaci s doplňkovou látkou jako takovou nebo zapracovanou do premixů nebo krmiv;
- c) vůči spotřebitelům, kteří jedí potraviny získané ze zvířat, jimž byla doplňková látka podána a která by mohla obsahovat rezidua doplňkové látky nebo její metabolity; bezpečnost použití bude obecně zajištěna tak, že se stanoví maximální limity reziduí (MLR) a ochranné lhůty;
- d) vůči zvířatům a lidem, vzhledem k selekci a rozšíření genů rezistentních vůči antimikrobiálním látkám;
- e) vůči životnímu prostředí, s ohledem na nebezpečí vyplývající z doplňkové látky samotné, nebo z jejích produktů přímo anebo vylučovaných zvířaty.

V zásadě musí být provedeny zkoušky, které stanoví identitu, podmínky užití, fyzikálně chemické vlastnosti, metody stanovení a účinnosti doplňkové látky, jejího metabolismu a reziduí, fyziologické a toxikologické účinky na cílový druh. Je-li doplňková látka určená pro kategorii zvířat náležejících k určitému druhu, musí být zkoušky týkající se účinnosti a reziduí vypracovány na této cílové kategorii. Zkoušky nezbytné pro posouzení rizika pro lidské zdraví a pro životní prostředí budou v zásadě záviset na povaze doplňkové látky a okolnostech jejího užití. V tomto ohledu není stanoveno žádné striktní pravidlo.

V případě potřeby mohou být požadovány dodatečné informace. Nebudou-li do dokumentace dodány jakékoliv v pokynech stanovené údaje, musí to být odůvodněno. Zejména zkoušky týkající se mutagenity, karcinogenity a reprodukční toxicity je možné opomenout pouze v případě, že chemické složení, praktické výsledky nebo jiné podklady odůvodněně vyloučí tyto účinky.

Musí být vypracovány odborné znalecké posudky o kvalitě, účinnosti a bezpečnosti doplňkové látky. Autoři těchto posudků musí mít odbornou způsobilost na základě vysokoškolského vzdělání získaného studiem v akreditovaném studijním programu v příslušné oblasti studia, musí být uznávanými odborníky v dotyčné oblasti a nesmějí být osobně zainteresováni na vedení pokusů začleněných do dokumentace. Posudky musí obsahovat kritické zhodnocení dokumentace, kterou dodal žadatel; pouhý souhrn fakt není dostačující.

Určení fyzikálně chemických, toxikologických a ekotoxikologických vlastností se uskuteční pomocí úředních metod nebo aktualizovaných metod, uznaných mezinárodními vědeckými institucemi. Užití jiných metod musí být odůvodněno.

Každá dokumentace musí obsahovat patřičný souhrn zkoušek a návrh přílohy a může obsahovat monografii. Dokumentace týkající se antibiotik, kokcidiostatik a léčebných substancí a růstových stimulátorů musí být doplněna monografií v souladu s přílohou č. 18 této vyhlášky a musí umožnit, aby dotyčná doplňková látka mohla být identifikována a charakterizována. Identifikační záznam musí být předložen pro všechny doplňkové látky.

U doplňkových látek určených výhradně do krmiv pro domácí zvířata není vždy nutné tyto doplňkové látky podrobovat vyčerpávajícímu počtu pokusů na chronickou toxicitu, mutagenitu, reprodukční toxicitu a karcinogenitu, tak jako se požaduje pro doplňkové látky určené ke krmení hospodářských zvířat, jejichž produkty jsou určené k lidské spotřebě. Zkoušky reziduí obsažených v domácích zvířatech nejsou požadovány.

Zkouška metabolismu doplňkových látek u cílových zvířat určených k produkci potravin a u laboratorních druhů užívaných pro testování toxicity se provádí podle zvláštních právních předpisů) a je nezbytná z toho důvodu, aby:

- a) se zajistilo, že existují adekvátní údaje o toxicitě výchozí doplňkové látky a jakéhokoliv metabolitu produkovaného u cílového druhu, jimž by mohl být spotřebitel vystaven. Za tím účelem je důležité srovnání metabolismu doplňkové látky u cílového druhu a u laboratorních druhů zvířat použitých pro testování toxicity;
- b) se identifikoval a kvantifikoval vhodný marker reziduí použitelný pro stanovení

MLR pro značení reziduí a délky doby ochranných lhůt u finálního produktu.

1.

Souhrn údajů

Souhrn musí být uspořádán v pořadí podle přílohy a obsahovat všechny složky ve stejném pořadí jako příloha s odkazem na příslušné stránky v dokumentaci.

2.

Identita, vlastnosti a podmínky užití doplňkové látky; kontrolní metody

2.1. Identita

2.1.1. Navrhovaný chráněný název

2.1.2. Typ podle jejího hlavního účinku. Pokud možno je vhodné dodat informace o způsobu působení. Jakékoliv jiné aktivní látky se musí specifikovat.

2.1.3. Kvalitativní a kvantitativní složení (aktivní látka, jiné složky, nečistoty, variabilita jednotlivých šarží). Je-li aktivní látka směsí aktivních složek, z nichž každá je jasně definovatelná, hlavní složky musí být popsány odděleně s uvedením jejich poměru ve směsi.

2.1.4. Fyzikální stav, rozdělení podle velikosti částic, forma částic, hustota, objemová hustota; pro kapaliny: viskozita, povrchové napětí.

2.1.5. Způsob výroby, včetně jakéhokoliv případného zvláštního zpracování.

2.2. Vlastnosti aktivní(ch) látky (látek)

2.2.1. Generický název, chemický název podle názvosloví IUPAC (Mezinárodní svaz pro čistou a aplikovanou chemii), jiné generické mezinárodní názvy a zkratky. Číslo CAS (Chemical abstracts service number).

2.2.2. Strukturální vzorec, molekulární vzorec a molekulární hmotnost

Pro aktivní látky z fermentačních výrob: mikrobiální původ (název a místo sbírky kultur, uznávané jako mezinárodní depositum přednostně v Evropské unii, kde je kmen uložen, číslo uložení a veškeré morfologické, fyziologické, genetické a molekulární vlastnosti důležité pro jeho identifikaci). U geneticky modifikovaných kmenů musí být uvedeny informace o genetické modifikaci.

2.2.3. Čistota

Identifikace a kvalifikace případných chemických a mikrobiálních nečistot a toxických látek, potvrzení neexistence produkce organismů.

2.2.4. Důležité vlastnosti

Fyzikální vlastnosti chemicky definovaných látek: konstanta rozkladu, pKa, elektrostatické vlastnosti, bod tání, bod varu, hustota, tlak páry, rozpustnost ve vodě a organických rozpouštědlech, Kow a Koc, hmotové a absorpční spektrum, údaje NMR,

případné izomery a jakákoliv jiné důležité vlastnosti

2.2.5. Způsob výroby, čisticí procesy, užitá media a u výrobků z fermentace variabilita jednotlivých šarží.

2.3. Vlastnosti doplňkové látky: fyzikálně chemické a technologické vlastnosti

2.3.1. Stabilita každé formy doplňkové látky při vystavení vlivu vnějších podmínek jako je světlo, teplota, pH, vlhkost, kyslík a obalové materiály. Předpokládaná trvanlivost doplňkové látky v obchodovatelné formě.

2.3.2. Stabilita každé formy doplňkové látky při přípravě a skladování premixů a krmiv zejména stabilita za předpokládaných podmínek výroby nebo skladování (vlhkost, teplota, tlak, stříh, doba a obalový materiál). Možné zhoršení jakosti nebo rozklad výrobků. Předpokládaná trvanlivost doplňkové látky.

2.3.3. Jiné patřičné fyzikálně chemické nebo technologické vlastnosti pro vytváření a zachování homogenních směsí v premixech a krmivech, protiprašné a elektrostatické vlastnosti, rozpustnost v kapalinách.

2.3.4. Neslučitelnost nebo interakce k nimž by mohlo dojít ve styku s krmivem, nosiči, jinými povolenými doplňkovými látkami nebo léčebnými substancemi.

2.4. Podmínky užití doplňkové látky.

2.4.1. Má-li doplňková látka technologicky a zootechnicky významné účinky, musí splňovat požadavky jak pro technologické, tak i zootechnické hledisko. Požadavky týkající se každé doplňkové látky musí být označeny a odůvodněny.

2.4.2. Navrhované technologické užití při výrobě krmiva nebo případně krmných surovin.

2.4.3. Navrhovaný způsob použití ve výživě zvířat (například: druhy nebo kategorie zvířat, věkové skupiny, produkční stadium zvířat, typ krmiva a kontraindikace).

2.4.4. Navrhovaný způsob a hladina zpracování do premixů a krmiv nebo popřípadě do krmných surovin a množství, vyjádřené jako podíl doplňkové látky a chemicky definovaných látek pro premixy krmiva, nebo případně krmné suroviny s navrhovaným dávkováním do konečného krmiva a navrhovanou dobu podání a v případě potřeby délka ochranné lhůty.

2.4.5. Je nutno uvádět údaje týkající se jiného známého užití aktivní látky např. v potravinách, humánní nebo veterinární medicíně, v zemědělství a v průmyslu.

2.4.6. Seznam údajů o bezpečnosti materiálu a v případě potřeby i opatření navrhovaná pro předcházení profesním rizikům a ochranné prostředky při výrobě, manipulaci, užití a disponování s materiálem.

2.5. Kontrolní metody

2.5.1 Popis metod použitých pro určení kritérií vyjmenovaných v bodech 2.1.3., 2.1.4.,

2.2.3., 2.3.1., 2.3.2., 2.3.3. a 2.3.4.

2.5.2. Popis kvalitativních a kvantitativních analytických metod určených k rutinní kontrole aktivní látky v premixech a krmivech. Tyto metody musí být validovány kruhovým testem zahrnujícím minimálně čtyři laboratoře nebo musí být validovány na místě podle mezinárodních sladěných pokynů pro interní validaci metod analýzy podle těchto parametrů: použitelnost, selektivnost, kalibrace, správnost, přesnost, rozsah, limity detekce, měřitelný limit citlivosti, mohutnost a proveditelnost. Je potřeba podat důkaz, že tyto vlastnosti se skutečně posuzovaly (2.5.4.).

2.5.3. Popis kvalitativních a kvantitativních analytických metod ke stanovení značených reziduí aktivní látky v tkáních cílových zvířat a živočišných produktech.

2.5.4. Metody uvedené v bodech 2.5.2. a 2.5.3. musí být doplněny o informace týkající se použité metody odběru vzorků, procentické výsledky, specifčnost, správnost, přesnost, hranice detekce, hranice kvantifikace a použitý postup validace. Musí být k dispozici referenční standardy aktivní látky, nebo značených reziduí, stejně jako informace o optimálních skladovacích podmínkách těchto referenčních standardů. Při navrhování metod se musí brát v úvahu skutečnost, že jejich limity množství musí být nižší než MLR. Dále se musí počítat s tím, zda je tato metoda vhodná pro rutinní analýzu.

3.

Zkoušky týkající se účinnosti doplňkové látky

3.1. Tyto studie se týkají technologických doplňkových látek, jako antioxidantů, konzervačních látek, pojiv, stabilizátorů, emulgátorů, želírovacích látek, látek na regulování pH atd., které jsou určeny ke zlepšení nebo stabilizování vlastností premixů a krmiv, avšak nemají přímé biologické účinky na živočišnou produkci. Všechny požadované vlivy nebo účinky musí být podloženy vědeckými údaji.

Účinnost doplňkové látky musí být prokázána pomocí vhodných kritérií, uvedených v metodách uznaných za přijatelné, za předpokládaných podmínek užití ve srovnání s vhodnými kontrolními krmivy. Tyto výzkumy musí být koncipovány a prováděny takovým způsobem, aby je bylo možno statisticky vyhodnocovat.

Musí být předloženy úplné informace o aktivních látkách, přípravcích, premixech a testovaných krmivech, referenční číslo šarže, podrobné zpracování a testovací podmínky. U každého pokusu se musí popsat příznivé i nepříznivé účinky, a to jak v rovině technologické, tak i biologické.

3.2. Zkoušky o účincích na zvířatech Zkoušky týkající se zootechnických doplňkových látek musí být provedeny na cílových druzích /kategoriích zvířat, jimž je doplňková látka určena, ve srovnání s negativními kontrolními skupinami (to znamená skupinami, které nepřijímají antibiotika ani stimulatory růstu ani žádné jiné léčebné látky) a případně se skupinami zvířat, která přijímají krmiva obsahující doplňkové látky povolené, jejichž účinnost je známa a jež jsou užívány v doporučených dávkách (pozitivní kontrola). Zvířata musí být zdravá a přednostně pocházet z homogenní skupiny.

Zkoušky musí umožnit posouzení účinnosti doplňkové látky v souladu se zemědělskou praxí. Pokud možno by se měly použít podobné vzory protokolů pro všechny pokusy, aby pak údaje mohly být ověřeny celistvě a souhrnně (pokud to testy vyžadují) pro statistické posouzení.

Nedoporučuje se žádný jednotný vzor, jistá pružnost je přitom ponechána pro vědecký názor na vzor a provádění studií. Použitý experimentální protokol musí být odůvodněn vzhledem k předpokládanému použití doplňkové látky a musí zahrnovat úvahu o odpovídající statistické průkaznosti.

3.2.1. U kokcidiostatik a jiných léčebných látek. Musí se především upozornit na existenci zvláštních účinků (například kontrolované druhy, dotyčné stádium nebo dotyčná stadia vývojového životního cyklu), a zejména na profylaktické vlastnosti například na patologické jevy, úmrtnost, počet oocyst, počet lézí.

Musí se sdělit informace týkající se vlivu na produkční účinnost a na přírůstek živé hmotnosti.

Požadované údaje o účinnosti se týkají tří etap na pokusech s cílovými zvířaty:

a) kontrolované pokusy v klecích (jednotlivé a smíšené infekce);

b) kontrolované pokusy při volném ustájení (simulované podmínky užití);

c) kontrolované pokusy v terénu (skutečné podmínky užití)

Současně a v případě potřeby se musí v rámci pokusů týkajících se produkční účinnosti zapisovat doplňující údaje, aby bylo možno posoudit vzájemné působení růstu a konverze krmiva, nebo účinky na oplodněnost a líhnutí vajec (plemenná drůbež).

3.2.2. U jiných zootechnických doplňkových látek Musí se dodat informace o účincích na příjem krmiva, tělesnou hmotnost, produkční účinnost (přednostně v sušině), jakost a výtěžnost produktů a jakýkoliv jiný parametr, který má kladný účinek na zvíře, životní prostředí, výrobce nebo spotřebitele. Případně by studie měly zahrnovat údaj o vztahu dávky a reakci na ni.

3.2.3. Experimentální podmínky Pokusy se musí provádět minimálně na dvou různých místech. Musí být vypracovány dvě samostatné zprávy, v nichž se přesně uvedou výsledky kontrol a každého experimentálního zákroku. Protokol o pokusu musí být vypracován pečlivě a musí obsahovat níže popsané základní údaje :

3.2.3.1. Stádo nebo hejno: místo a počet, podmínky krmení a chovu, způsob krmení; u vodních druhů: velikost a počet nádrží nebo klecí na farmách a kvalita vody.

3.2.3.2. Zvířata: druh (u vodních druhů určených k lidské spotřebě se uvede jméno obecné a po něm v uvozovkách latinské jméno nebo název dle Linné-a), plemeno, věk, pohlaví, způsob označení, fyziologické stádium a celkový zdravotní stav.

3.2.3.3. Počet pokusných a kontrolních skupin, počet zvířat v každé skupině. Počet zvířat použitých pro pokusy musí umožnit statistickou analýzu. Musí se uvést použité statistické hodnotící metody. U každé kategorie zvířat, u které se mají projevit účinky, musí být provedeny nejméně tři nezávislé srovnávací pokusy na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$ u každé sledované kategorie zvířat, aby bylo vidět předpokládaný účinek. V případě přežvýkavců lze přijmout nižší hladinu

pravděpodobnosti $p < 0,10$. Ve zprávě musí být zahrnuta všechna zvířata nebo experimentální celky, s nimiž se pokusy prováděly. Případy, které není možné zařadit z důvodu nedostatků nebo ztráty údajů, musí být uvedeny ve zprávě a jejich přítomnost ve skupinách zvířat musí být hodnocena.

3.2.3.4. Diety: popis výroby a kvantitativní složení diety (diet) s uvedením použitých složek, příslušných živin (analyzované hodnoty) a energetické hodnoty. Údaje o příjmu krmiva .

3.2.3.5. Koncentrace aktivní látky (a v daném případě látek) použitých pro srovnávací účely v krmivech musí být stanovena kontrolní analýzou podle příslušné uznané metody. Referenční čísla šarží.

3.2.3.6. Data a přesná doba trvání pokusů. Data a povaha provedených zkoušek.

3.2.3.7. Studie o určení dávky: účelem těchto studií je vysvětlit důvody vedoucí k výběru dávky nebo stupnici dávkování, která vykazuje optimální účinek. Určení dávky se zakládá na kontrole (bez antibiotik, stimulátorů růstu nebo jiných léčebných látek) a na minimálně třech nenulových úrovních u cílových zvířat.

3.2.3.8. Okamžik a výskyt jakéhokoliv nežádoucího účinku pokusů u jedinců nebo skupin musí být zaznamenán včetně veškerých podrobností o programu pozorování použitým při zkoušce.

3.2.3.9. Všechny doplňkové látky zkoušené za podmínek v terénních podmínkách musí mít dobré vědecké záznamy zaměřené na bezpečnost pro uživatele, spotřebitele, zvíře a životní prostředí. Neuspokojuje-li doplňková látka požadavky týkající se bezpečnosti spotřebitele, pak jakákoli prováděná studie musí být koncipována tak, aby zabránila vstupu živočišných produktů vzešlých z pokusných zvířat do lidského potravního řetězce.

3.3. Studie o jakosti produktů živočišného původu Produkty živočišného původu musí být přezkoušeny z hlediska jejich organoleptických, nutričních, hygienických a technologických vlastností.

3.4. Studie o účincích na vlastnosti živočišných odpadů Je-li doplňková látka určena k tomu, aby změnila některé vlastnosti živočišných odpadů (například dusík, fosfor, zápach, objem) požadují se studie demonstrující tyto vlastnosti.

4.

Zkoušky týkající se bezpečnosti užití doplňkové látky

Zkoušky uvedené v tomto oddílu jsou určeny k vyhodnocení

- bezpečnosti užití doplňkové látky pro cílové druhy,
- jakéhokoliv rizika souvisejícího se selekcí, nebo přenosem rezistence vůči antibiotikům a se zvyšující se persistencí a množením enteropatogenů,
- rizik pro spotřebitele, která by mohla být způsobena konzumací potravin obsahujících rezidua doplňkové látky nebo jejich metabolitů,
- rizik při vdechnutí, jiného kontaktu sliznic, očí nebo kůže u osob zabývajících se

manipulací s doplňkovou látkou v původním stavu nebo zapracované do premixů nebo krmiv,

- rizik z nežádoucích účinků na životní prostředí z doplňkové látky jako takové nebo produktů odvozených z doplňkové látky přímo, nebo vyloučených zvířaty.

Je třeba vzít v úvahu známé inkompatibility, nebo interakce mezi doplňkovou látkou a veterinárními léčivými, anebo složkami diety určené pro daný druh.

Tyto zkoušky se budou obvykle požadovat jako celek pro každou doplňkovou látku, pokud není uvedena zvláštní výjimka nebo změna.

Pro návrh na rozšíření povoleného užití pro druh, který je z fyziologického a metabolického hlediska blízký druhu, pro který již bylo užití doplňkové látky povoleno, se obvykle souhlasí s méně obsáhlou žádostí. Takový soubor redukováných údajů musí ukázat bezpečnost pro nový druh a absenci výrazných rozdílů v základním metabolismu a reziduí v požitelných tkáních. Navržená MLR a ochranná lhůta pro daný druh musí být odůvodněny.

Pro posouzení rizik pro spotřebitele a následné určení MLR a ochranné lhůty, je třeba dodat tyto informace:

- chemickou strukturu aktivní látky,
- metabolismus u navrhovaných cílových druhů,
- skladbu reziduí u těchto cílových druhů,
- zkoušku o odbourávání reziduí z tkání,
- údaje o biologických účincích aktivní látky a jejích metabolitů.

Znalost biologické využitelnosti reziduí (vázaných a volných) může být také užitečná, zejména pokud dochází k tvorbě mnoha metabolitů a žádný marker reziduí není doložen (viz 4.1.3.3.)

Dále se požaduje znalost složení a fyzikálně chemické a biologické vlastnosti hlavních vyloučených produktů pocházejících z doplňkové látky pro stanovení rozsahu zkoušek nezbytných k posouzení rizik nežádoucích účinků na životní prostředí nebo jejich přetrvávání v životním prostředí (viz odstavec 4.5.).

4. 1. Zkoušky na cílových druzích zvířat

4.1.1. Testy tolerance na cílových druzích/ kategoriích zvířat Účelem je určit limit bezpečnosti (tj. hranici mezi maximální navrhovanou dávkou v krmivech a minimální dávkou způsobující nežádoucí účinky). Limit bezpečnosti jednoho faktoru nejméně z deseti se však považuje za dostatečný, aby se již nežádaly doplňující testy. Takový test tolerance musí být proveden u cílových druhů /kategorií zvířat, přednostně po celé produkční období, i když normálně je přijatelný test trvající jeden měsíc. To vyžaduje minimálně posouzení klinických příznaků a jiných parametrů pro stanovení účinků na zdraví cílových zvířat. Musí být zařazena negativní kontrolní skupina (bez antibiotik,

růstových stimulátorů nebo jiných léčebných látek). Mohou být také požadovány dodatečné parametry podle toxikologického profilu. Jakýkoliv nežádoucí účinek odhalený během pokusů na stanovení účinnosti se musí uvést také v tomto oddílu. Pokud je produkt určen k použití na zvířatech, která by mohla být použita k chovu, musí být studie prováděny takovým způsobem, aby se zjistilo případné zhoršení rozmnožovací funkce samce nebo samice nebo škodlivé účinky na potomstvo, způsobené podáváním zkoušené doplňkové látky.

4.1.2. Mikrobiologická bezpečnost doplňkové látky

4.1.2.1. Všechny zkoušky musí být prováděny s nejvyšší navrhovanou dávkou.

4.1.2.2. Vykazuje-li aktivní látka antimikrobiální aktivitu při koncentraci, ve které je obsažena v krmivu, musí být určena minimální inhibiční koncentrace - MIK (minimum inhibitory concentration - MIC) vůči vhodným patogenním i nepatogenním, endogenním i exogenním bakteriím v souladu se standardizovanými postupy.

4.1.2.3. Testy určující schopnost doplňkové látky

- způsobit křížovou rezistenci na odpovídající antibiotika,

- selektovat rezistentní bakteriální kmeny za provozních podmínek užití u cílových druhů, a pokud tomu tak je, provést studie genetických mechanismů pro přenos rezistentních genů.

4.1.2.4. Testy určující účinnost doplňkové látky na

- určitý počet oportunních patogenů přítomných v zažívacím traktu (například enterobakterie, enterokoky a klostridie),

- pomnožování nebo vylučování odpovídajících zoonotických mikroorganismů, například *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.

4.1.2.5. V případech, že aktivní látka vykazuje antimikrobiální aktivitu, musí být provedeny provozní zkoušky monitorování rezistence bakterií na doplňkovou látku.

4.1.3. Zkoušky metabolismu a reziduí

4.1.3.1. Účelem zkoušek je

- stanovení metabolických cest aktivní látky, jako základu pro její toxikologické vyhodnocení,

- identifikace reziduí a stanovení jejich kinetiky v požitelných tkáních a produktech (mléko, vejce),

- identifikace vyloučených látek, jako první požadavek pro posouzení jejich dopadu na životní prostředí.

V určitých případech, například u doplňkových látek získaných fermentací se může ukázat, že je nutné tyto zkoušky rozšířit na jiné, během fermentace přidané nebo odvozené látky. Zjištění průkazné toxicity vzhledem k toxicitě aktivní složky nebo aktivních složek doplňkové látky by tuto okolnost vysvětlila.

4.1.3.2. Farmakokinetika Návrh a experimentální schema zkoušek musí vzít v úvahu specifika cílové populace z hlediska anatomie, fyziologie (věk, druh, pohlaví), zootechnické kategorie i životního prostředí. Je-li třeba, musí být přihlédnuto k vlivu na střevní mikrofloru a na mikrofloru, předžaludků, enterohepatický cyklus a činnost slepého střeva. Testované dávkování musí být dávkování, s jakým se počítá pro užití a případně, je-li to odůvodněno, násobek této dávky. Aktivní látka (včetně značené látky) musí být zapracována do krmiva, kromě případu, kdy je odůvodněno, že se tak nestane.

Požadují se tyto studie:

- metabolická bilance a kinetika v plazmě/krvi po podání jediné dávky, aby se mohla posoudit rychlost a rozsah absorpce, distribuce a vylučování (moč, výkaly, žluč, vydechaný vzduch, mléko nebo vejce),
- identifikace majoritních metabolitů (>10%) v exkrementech, kromě případu, kdy se zdá, že minoritní metabolit (<10%) by mohl být toxikologicky významný,
- rozložení značeného materiálu v tkáních a produktech po podání jediné dávky zvířatům, která již jsou ve vyrovnaném stavu, jehož bylo dosaženo neznačenou doplňkovou látkou. Zkoušky uvedené v bodech 4.1.3.1 a 4.1.3.2. musí obsahovat i metody s použitím izotopů nebo jiné odpovídající metody.

4.1.3.3. Zkoušky reziduí

- identifikace takových reziduí (původní sloučenina, metabolity, produkty rozpadu, vázaná rezidua²⁾, která představují více než 10% všech reziduí (kromě toho, kdy by mohl být minoritní metabolit toxikologicky významný) v požitelných tkáních a produktech (mléko, vejce) za metabolické rovnováhy, tj. po podání násobků dávek značené látky; poměr značeného rezidua ke všem reziduíům,
- kinetická studie reziduí v tkáních (včetně mléka a v daném případě vajec) během období jejich vylučování po dosažení stabilního stavu a za použití nejvyšší navrhované dávky profilující do metabolismu, identifikace cílové tkáně³⁾ a značeného rezidua,
- vylučovací zkouška značeného rezidua z cílových tkání (včetně mléka a v daném případě vajec) po vysazení doplňkové látky, které následuje po jeho opakovaném podávání, v souladu s navrhovanými podmínkami užití a které stačí k docílení stabilního stavu, aby bylo možno stanovit ochrannou lhůtu na základě stanoveného maximálního limitu reziduí MLR,
- ochranná lhůta pro doplňkovou látku nesmí být kratší než doba nutná pro to, aby koncentrace značeného rezidua stanovená v cílové tkáni klesla pod hodnotu MLR (95 % hranice spolehlivosti). Body měření, časově určené, vybrané vhodným způsobem ve vazbě na fázi vylučování aktivní látky a jejich metabolitů, a minimálně čtyři zvířata na každý bod podle druhů (velikost, genetická variabilita) musí být považovány za požadované minimum⁴⁾.

4.2. Zkoušky na laboratorních zvířatech Tyto zkoušky musí být prováděny

s aktivní látkou za použití mezinárodně uznávaných standardních pokusných metod, jak jsou popsány v pokynech OECD pro metodologické ukazatele a v souladu se zásadami správné laboratorní praxe. Mohou být nezbytné i doplňující zkoušky o zvláštních metabolitech, produkovaných u cílových druhů, pokud se tyto nevytvořily v testu laboratorních druhů ve významném rozsahu. Stejně tak, pokud jde o údaje u člověka, se kterými se musí počítat, je třeba rozhodnout, které doplňující zkoušky se provedou.

4.2.1. Akutní toxicita Akutní orální toxicita musí být provedena nejméně na dvou druzích savců. Jeden laboratorní druh může být v případě potřeby nahrazen cílovým druhem. Nebude nutné označovat přesně LD₅₀ ; přibližné určení minimální smrtelné dávky obvykle stačí. Aby se snížil počet testovaných zvířat a jejich utrpení, nesmí maximální dávkování překročit 2 000 mg/kg živé hmotnosti a doporučuje se použití náhradních metod (limitní test, metoda fixní dávky, metoda třídy akutní toxicity). Nebezpečí pro pracovníky musí být posuzováno v sérii zkoušek, v nichž se produkt (aktivní látka a nosič ve formě, v níž bude uvedena do oběhu) použije. Zkoušky dráždivosti pokožky se musí také provést a pokud jsou jejich výsledky pozitivní, je třeba posoudit dráždivost sliznic (například očí). Také se musí posoudit alergické účinky - kožní senzibilizace. Zkoušky akutní toxicity při vdechnutí se musí provádět, jestliže produkt může tvořit prach nebo lze vdechovat jeho výpary.

4.2.2. Zkoušky genotoxicity, včetně mutagenity Za účelem identifikace aktivních látek a případně jejich metabolitů a produktů degradace, které mají mutagenní a genotoxické vlastnosti, musí být provedena výběrová kombinace nejméně tří různých testů na genotoxicitu. Testovaný soubor musí obvykle obsahovat testy v prokaryotickém i eukaryotickém systému, včetně systémů testů in vitro a in vivo na savcích. V případě potřeby se testy musí provádět bez i s metabolickou aktivací u savců. Je třeba uvést důvody, které vedly k výběru testů vzhledem k jejich spolehlivosti pro posouzení genotoxických účinků na různá genetická zakončení na úrovni genu, chromozomu a genomu. Mohou se uvádět doplňující testy podle získaných výsledků a na základě celého toxikologického profilu látky a užití, k němuž je určena. Pokusy se musí provádět v souladu se schválenými a v současnosti validovanými postupy. Pokud je pokus zaměřen na kostní dřev, je případě negativního výsledku nutný důkaz o tom, že buňky byly vystaveny působení testované látky.

4.2.3. Zkoušky subchronické orální toxicity (90 dní) Doba testů musí být minimálně 90 dní. U doplňkových látek určených k použití u živočišných druhů, z nichž se vyrábějí potraviny, musí se zkoušky provádět na dvou živočišných druzích, z čehož jeden nesmí patřit k řádu hlodavců, ale může být cílovým druhem. U doplňkových látek určených pro použití u zvířat, která nejsou určena k lidské spotřebě, stačí zkoušky na cílovém druhu: aktivní látka musí být podávána orálně minimálně ve třech úrovních jako doplněk podávání kontrolní skupině, aby se získala odpověď na dávku. Maximální dávka musí za normálních okolností odhalit přítomnost škodlivých účinků. Nejnižší úroveň dávkování nemusí vykazovat žádnou známku toxicity.

4.2.4. Zkoušky chronické orální toxicity (včetně zkoušek karcinogenity).

Zkoušky karcinogenity nemusí být nezbytné, pokud aktivní látka a její metabolity:

- dávají stále negativní výsledky ve vhodné sérii testů na genotoxicitu,

- nejsou strukturálně propojeny se známými kancerogeny a

- nevyvolávají žádný účinek ukazující na případnou (pre)neoplazii při zkouškách chronické toxicity.

4.2.5. Zkoušky reprodukční toxicity včetně teratogenity

4.2.5.1. Dvougenerační zkouška reprodukční toxicity

- zkoušky na reprodukční funkci musí být prováděny v rozsahu nejméně dvou filiálních generací (F1, F2) a mohou být kombinovány se zkouškou teratogenity. Zkoušená látka musí být podávána samcům a samicím ve vhodnou dobu před pářením. V podávání se musí pokračovat až do odstavu zvířat generace F2.

- Všechny relevantní parametry týkající se oplození, březosti, porodu, mateřského chování, kojení, růstu a vývoje potomstva generace F1 od početí do dospělosti a vývoje potomstva generace F2 až do odstavu se musí pečlivě sledovat a zaznamenat.

4.2.5.2. Zkoušky teratogenity Zkoušky teratogenity zahrnují embryotoxicitu a foetotoxicitu. Musí se provádět nejméně na dvou druzích.

4.2.6. Zkoušky metabolismu a ukládání Musí být provedeny zkoušky absorpce, ukládání (rozložení) v tělních tekutinách a tkáních a ve vylučovacích cestách. Zkouška metabolismu zahrnující metabolickou bilanci a identifikaci hlavních metabolitů v moči a výkalech se musí provést na zvířatech obou pohlaví a stejných druhů, jaké byly použity v toxikologických zkouškách. Jedna dávka značené molekuly (bod 4.1.3) se musí podat v ustáleném stavu rovnováhy, jehož bylo dosaženo s neznačenou sloučeninou v dávce podobné nejvyšší úrovni navržené pro použití u cílového druhu.

4.2.7. Biologická využitelnost reziduí Při posuzování rizika pro spotřebitele, spojeného s určitými rezidui obsaženými v živočišných produktech, zejména vázanými rezidui, je třeba brát v úvahu dodatečný faktor bezpečnosti založený na určení jejich biologické využitelnosti za použití vhodných laboratorních zvířat a uznaných metod.

4.2.8. Jiné specifické toxikologické a farmakologické zkoušky Musí se provést další zkoušky poskytující doplňující informace použitelné pro posouzení bezpečnosti aktivní látky a jejích reziduí, pokud pro to existuje jakýkoliv závažný důvod.

4.2.9. Určení koncentrace bez pozorovaného účinku (NOEL-KBPÚ) Všechny výše uvedené výsledky a veškeré důležité publikované údaje (včetně jakékoliv vhodné informace o účincích aktivní látky na člověka) a případně informace o úzce souvisejících chemických strukturách se musí brát v úvahu pro určování koncentrace bez pozorovaného účinku (NOEL-KBPÚ), vyjádřené v mg/kg tělesné hmotnosti na den. Musí být vybrána nejnižší KBPÚ. KBPÚ, která se má použít pro výpočet přijatelné denní dávky (ADI) však musí být podle okolností vybrána na základě toxikologických nebo farmakologických účinků. U některých doplňkových látek, například antibakteriálních látek, může být vhodnější určovat ADI na základě účinků na lidskou střevní mikroflóru. Neexistují-li mezinárodní přijaté a validované metody pro popis střevní flóry, pak mohou být vhodnější účinky na vybrané a citlivé bakteriální kmeny lidského střeva.

4.3. Vyhodnocení bezpečnosti pro člověka

4.3.1. Návrh přijatelné denní dávky (ADI) pro doplňkovou látku V případě potřeby by se měla navrhnout přijatelná denní dávka ADI. ADI (vyjádřená v mg doplňkové látky nebo materiálu vztahujícímu se k doplňkové látce na osobu a den) se odvodí tak, že se vydělí koncentrace bez pozorovatelného účinku (KBPU mg/kg tělesné hmotnosti) vhodným faktorem bezpečnosti a vynásobí průměrnou hmotností lidského těla, tj. 60 kg. Tato KBPU, vyjádřená v mg na kg tělesné hmotnosti na den může být vybrána s použitím toxikologických nebo farmakologických výsledků. V některých případech může být ADI, stanovená na doplňkových látkách s mikrobiologickými vlastnostmi, vhodnější. Výběr bude záležet na tom, která vlastnost je nejdůležitější z hlediska zdravotního rizika pro spotřebitele.

Faktor bezpečnosti užitý pro stanovení ADI jednotlivé doplňkové látky musí být vybrán s ohledem na následující :

- na povahu biologického účinku užitého pro určení KBPU,
- na důležitost tohoto účinku pro člověka a reverzibilitu účinku,
- na rozsah a kvalitu údajů pro určení KBPU,
- na jakoukoliv informaci o účinku nebo účincích složek reziduí.

Obvykle se použije pro výpočet ADI faktor bezpečnosti nejméně 100 (to znamená faktor 10 pro umožnění potenciální mezidruhové variace a další faktor 10 pro umožnění možných rozdílů v reakci u různých lidí. Pokud jsou pro aktivní látku k dispozici údaje pro lidi, může se přijmout nižší faktor bezpečnosti.

4.3.2. Návrh maximálních limitů reziduí (MLR) pro doplňkovou látku Pro výpočet MLR se předpokládá, že příjem požitelných tkání, mléka a vajec představuje jediný zdroj, jemuž je člověk potenciálně vystaven. Pokud tomu tak není, musí být vzaty v úvahu jiné zdroje.

Řada takových substancí se používala jako doplňkové látky v krmivech i pro jiné aplikace. V těchto případech by měly být vypočítané MLR totožné. Mohou zde být také příklady, kdy se na základě přísných vědeckých úvah vypočítávají různé MLR pro každé užití jestliže způsob, množství, četnost dávkování a doba trvání podávání jsou dostatečně odlišné od těch, které jsou obvykle používány pro doplňkovou látku v krmivech, a že jsou zde důkazy ukazující, že kinetika, nebo metabolismus může vyústit v odlišné profily reziduí. Pro tyto případy se předem stanovilo, že se použijí nejpřísnější MLR.

Ke stanovení MLR musí být definována chemická povaha materiálu příbuzného léčivé substanci, který je určen k užití pro upřesnění hladin reziduí ve tkáních. Tato látka se nazývá reziduální marker. Tato složka rezidua nemusí být nutně důležitým reziduem z toxikologického hlediska, avšak musí být vybrána jakožto vhodný ukazatel představující všechna významná rezidua. Poměr reziduálního markeru a veškerých radioaktivních reziduí ve vztahu k ADI (tj. poměr reziduálního markeru k veškerým

radioaktivním rezidua, reziduální marker k veškerým biologicky aktivním reziduí) musí být stanoveny ve všech časových bodech během zkoušek o odbourávání. Zejména je nutné tento poměr znát u časového bodu, který byl vybrán pro určení MLR. Analytická metoda vhodná pro tento reziduální marker musí být také k dispozici, aby bylo zaručeno dodržování MLR.

Pro stanovení MLR (vyjádřených v g/kg reziduálního markeru na kg použitelné syrové tkáně nebo produktu) na základě ADI, je třeba použít následující hodnoty denní spotřeby lidské stravy:

	Savci	Ptáci	Ryby
Svaly	300 g	300 g	300 g*
Játra	100 g	100 g	
Ledviny	50 g	10 g	
Tuk	50 g**	90 g***	
+ mléko	1500 g		
+ vejce		100 g	
* Svaly a kůže v přirozených poměrech			
** U prasat 50 g tuku a kůže v přirozených poměrech			
*** Tuk a kůže v přirozených poměrech			

Jednotlivé MLR v různých tkáních musí brát v úvahu kinetiku vylučování reziduí v tkáních živočišného druhu zamýšleného pro užití. Je požadována analytická metoda vykazující limit kvantifikace nižší než MLR (viz oddíl II bod 2.5.3.).

Jestliže by nějaká látka vytvářela reziduum v tkáních a produktech, musí být MLR navrženy takovým způsobem, aby celkové množství rezidua významného z toxikologického (nebo mikrobiologického) hlediska, přijímaného⁵⁾ každý den, bylo nižší než ADI (viz tabulka nahoře).

MLR smí být stanoven až po zvážení a zahrnutí všech dalších možných zdrojů reziduí, kterým je spotřebitel vystaven. U některých doplňkových látek mohou být rezidua přítomna pod hodnotami MLR v mléce, vejcích nebo mase, mohou však narušit kvalitu potravin při jejím zvláštním zpracování, například užití mléka pro výrobu sýra. U těchto doplňkových látek se může jako doplněk stanovení hodnot MLR uvést, že se počítá s "maximálním reziduem slučitelným se zpracováním (potravin)".

MLR nebude požadován za určitých okolností, jakými jsou:

- nulová biologická využitelnost reziduí a nulový škodlivý účinek na lidská střeva, včetně jejich mikroflóry,
- úplné odbourání na živiny nebo na neškodné látky u cílových druhů,
- ADI "nespecifikována" z důvodu nízké toxicity při pokusech na zvířatech,
- případ, kdy je užití zcela omezeno na krmiva pro domácí zvířata,
- případ, kdy je látka zároveň povolena jako potravinářské aditivum; MLR není

obvykle nutný, je-li reziduální marker v zásadě výchozí (mateční) látkou a nepředstavuje-li pouze nevýznamnou frakci ADI potravinářského aditiva.

4.3.3. Návrh ochranné lhůty pro doplňkovou látku Ochranná lhůta bude stanovena na základě MLR. Ochranná lhůta zahrnuje dobu následující po ukončení podávání navrhované formy doplňkové látky, která je nezbytná k tomu, aby hladiny rezidua klesly pod MLR (výše spolehlivosti 95%). Pro stanovení ochranné lhůty je možné označit dílčí požitelnou tkáň, často nazývanou jako cílová tkáň, která zastupuje všechny ostatní.

4.4. Posouzení bezpečnosti pro pracovníky Pracovníci mohou být vystaveni působení doplňkové látky hlavně při vdechnutí nebo dotyku při výrobě, manipulaci nebo užití doplňkové látky, například pracovníci v zemědělství jsou potenciálně vystaveni účinkům při manipulaci nebo míchání doplňkové látky. Musí být dodány doplňující informace o způsobu zacházení s látkami. Tyto informace musí obsahovat posouzení možných rizik pro pracovníky. Získaná zkušenost ve výrobní jednotce často představuje důležitý zdroj informací pro posouzení rizik pro pracovníky, která vyplývají z toho, že pracovníci jsou vystaveni účinkům doplňkové látky ze vzduchu a dotykem. Látky, jimž je zapotřebí věnovat mimořádnou pozornost, jsou doplňkové látky, krmiva zpracovaná s doplňkovými látkami, nebo výkaly zvířat ve formě suchého prachu nebo ze kterých může suchý prach vzniknout, a doplňkové látky pro krmiva, které mohou mít alergický potenciál.

4.4.1. Posouzení toxikologického rizika pro bezpečnost pracovníků

4.4.1.1. Účinky na dýchací ústrojí Musí být doloženo, že hladiny prachu ve vzduchu nepředstavují riziko pro zdraví pracovníků. Proto je v případě potřeby nezbytné doložit :inhalační testy na laboratorních zvířatech, publikované epidemiologické údaje, nebo vlastní údaje žadatele o jeho výrobním zařízení, nebo testy dráždivosti a testy na citlivost dýchacího ústrojí.

4.4.1.2. Účinky na oči a pokožku Musí být předloženy důkazy o tom, že nejsou známy případy dráždivosti, nebo senzibilizace u lidí. Tyto důkazy musí být doplněny výsledky validovaných testů na zvířatech týkajících se dráždivosti pokožky a očí a citlivosti způsobené možným použitím příslušné doplňkové látky.

4.4.1.3. Systémová toxicita Pro posouzení ostatních aspektů bezpečnosti pracovníků, musí být užity údaje, které vznikly doplněním požadavků na bezpečnost (včetně testů toxicity opakovaných dávek, mutagenicity, kancerogenicity a reprodukčních testů). Při tom je nutno připomenout, že kontaminace pokožky, nebo vdechnutí doplňkové látky jsou nejčastější cesty expozice, jíž jsou pracovníci vystaveni.

4.4.2. Posouzení expozice Musí být předloženy informace o tom, zda používání doplňkové látky je schopno vyvolat vznik expozice všemi cestami - vdechnutím, dotykem nebo požitím. Tyto informace musí zahrnovat kvantitativní vyhodnocení, které by se mělo týkat typické koncentrace ve vzduchu, kontaminace kůže nebo požití. Pokud kvantitativní údaje nejsou k dispozici, musí být dodán dostatek informací, který umožní adekvátní posouzení expozice.

4.4.3. Opatření ke kontrole expozice Při použití informací z hodnocení výsledků toxikologie a expozice musí být vypracován závěr o rizicích pro zdraví uživatelů (systémová toxicita, toxicita, dráždivost nebo citlivost), pokud jsou uplatňována opatření ke kontrole expozice přiměřená těmto podmínkám. Pokud je riziko nepřijatelné, musí být přijata bezpečnostní opatření ke kontrole expozice nebo jejího vyloučení. Přednostními řešeními je přepracování nebo modifikace výrobních postupů užití, nebo dispoic doplňkové látky. Používání osobních ochranných prostředků musí

být posledním krokem k ochraně před jakýmkoliv přetrvávajícím rizikem poté, kdy už byla zavedena kontrolní opatření.

4.5. Posouzení rizika pro životní prostředí Zohlednění dopadu doplňkových látek v krmivech na životní prostředí je důležité z toho důvodu, že podávání těchto doplňkových látek obvykle trvá dlouhou dobu (nebo celý život), mohou jím být dotčeny velké skupiny zvířat, mnohé doplňkové látky se málo vstřebávají a proto jsou z velké míry vylučovány v nezměněném stavu. V určitých případech však může být nutnost posouzení dopadu na životní prostředí omezena. Není namístě stanovovat přísná pravidla v těchto obecných pokynech. Aby se usnadnilo určování dopadu doplňkových látek na životní prostředí, musí se přijmout postupné kroky (viz "strom rozhodování"), kdy je možné v první fázi jasně identifikovat doplňkové látky, které nevyžadují doplňující testy. U ostatních doplňkových látek se požaduje druhá fáze zkoušek (fáze II A), aby se získaly doplňující informace, na jejichž základě může být rozhodnuto, že bude nutné provést další zkoušky (fáze II B).

4.5.1. Posuzování - fáze I. Účelem posuzování ve fázi I. je určit, zda doplňková látka nebo její metabolity může nebo nemůže mít významný dopad na životní prostředí, a to na základě údajů stanovených již pro jiné účely.

K fázi II se nemusí přistupovat, pokud se splní jedno ze dvou následujících kritérií:

a) chemická povaha a biologický vliv doplňkové látky i její užití ukazují, že dopad bude zanedbatelný: to znamená, když doplňková látka, nebo její hlavní metabolit(y) (více než 20% všech reziduí ve výkalech) jsou:

- fyziologické/přírodní látky (například vitamíny nebo minerální látka), které nezmění koncentraci v životním prostředí, dokud zde není pro to nějaký zřejmý závažný důvod (například měď),

- doplňkové látky určené pro domácí zvířata (s výjimkou koní):

b) nejhorší předpokládaná koncentrace v životním prostředí (PKŽP) je natolik nízká, aby byla brána v úvahu. Nejhorší PKŽP pro půdu by měla být stanovena z hnoje, který byl zakládán v době maximální exkrece hlavních složek rezidua (doplňkové látky, nebo jejich hlavních metabolitů), a byl rozmetán po půdě. PKŽP musí být vyhodnocena pro každou hlavní složku rezidua v hnoji a pro každý příslušný oddíl. U pozemního oddílu hnoje se nepožaduje žádné další posuzování, pokud PKŽP nepřekračuje 100 ug/kg pro sumu hlavních složek rezidua v hnoji, nebo pokud jsou tyto hlavní složky v hnoji rychle rozloženy (čas rozpadu DT 50 < 30 dní) (v případě, že jsou tyto údaje k dispozici) na přírodní složky nebo na koncentrace nižší než 100ug/kg, nebo jestliže je PKŽP v půdě (v hloubce 5 cm) nižší než u/kg.

Nejhorší PKŽP pro vodu může být stanovena buďto přímým vhozením sypkého krmiva nebo výkalů obsahujících doplňkovou látku a její metabolity do vodních nádrží nebo z průsaku látek obsažených ve výkalech nebo v půdě do spodní vody. Je-li PKŽP z hlediska kontaminace vodních nádrží nebo spodní vody spolehlivě určena jako nižší než 0,1 mikrog na litr, pak posuzování dopadu doplňkové látky na vodní prostředí podle fáze II.A není nutné.

Fáze II posuzování dopadu se bude obvykle požadovat, pokud žadatel není schopen dokázat, že navrhovaná doplňková látka spadá do některé z těchto vyjmutých skupin, nebo pokud je doplňková látka přímo uvolněna do prostředí (například v akvakultuře).

RIZIKO, JAKÉ PŘEDSTAVUJÍ DOPLŇKOVÉ LÁTKY V KRMIVECH PRO ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

Strom rozhodování FÁZE I.

Je doplňková látka fyziologická /přirodní látka, jejíž bezpečnost je známa (například vitamíny, některé minerály) ?

↓ → **ANO** → **STOP**
NE

Jsou cílovými zvířaty pouze domácí zvířata ?

↓ → **ANO** → **STOP**
NE

Dostává se doplňková látka do prostředí (například chov ryb) ?

↓ → **ANO** → **FÁZE II**
NE

Je doplňková látka nebo její hlavní metabolity přítomna v hnoji (>100 µg/kg) ?

↓ → **NE** → **STOP**
ANO

Je po rozmetání hnoje rozpad rychlý (DT 50 < 30 dní) ?

↓ → **ANO** → **STOP**
NE
↓

PKŽP ve spodní vodě > 0,1 µg/l
nebo PKŽP v půdě > 10 µg/kg

↓ → **NE** → **STOP**
ANO
↓
FÁZE II

4.5.2. Posuzování - fáze II

Fáze II obsahuje dvě části: fázi II A a fázi II B.

Musí být posouzena možnost bioakumulace doplňkové látky, nebo jejích hlavních metabolitů a její vliv na předpokládanou míru bezpečnosti. Bioakumulace se nepovažuje za potenciálně významnou, pokud je například Kow (rozdělovací koeficient) < 3. Příslušné zkoušky ve fázi II B budou obecně nutné, pokud není možné tuto míru bezpečnosti stanovit.

4.5.2.1. FÁZE II A

Účelem posuzování ve fázi II A je identifikovat riziko pro životní prostředí tím, že:

- se zpřesní výpočet předpokládané koncentrace nebo předpokládaných koncentrací v životním prostředí - PKŽP,
- se určí poměr mezi expozicí, hladinami doplňkové látky, nebo hlavními metabolity a krátkodobými nežádoucími účinky na zástupné živočišné nebo rostlinné druhy srovnatelné v dotyčném prostředí,
- se tyto výsledky užijí pro určení hodnoty (hodnot) předpokládané (-ných) koncentrace(-cí) bez účinku (PKBÚ).

Doporučuje se následující postup pro určení rizika:

a) Pokud výpočet nebyl proveden při fázi I, musí být přesněji vypočítána PKŽP pro každé dané prostředí. Při určování PKŽP se musí brát v úvahu:

- koncentrace doplňkové látky, nebo jejích hlavních metabolitů v hnoji následně po podání doplňkové látky zvířatům v navrhované dávce. Tento výpočet musí brát v úvahu objemy výkalů a míru dávkování,

- potenciální rozředění vyloučené doplňkové látky vázané na materiál obvykle ošetřovaný jako hnůj a uložený před jeho rozmetáním do půdy,

- absorpce/desorpce doplňkové látky a jejích metabolitů na půdě, přetrvávání reziduí v půdě DT50 a DT90; sediment v případě akvakultury,

- jiné faktory, jako například fotolýza, hydrolýza, vypařování, rozklad v půdě nebo v systémech vodního sedimentu, rozředění při orbě atd.

Nejvyšší hodnota PKŽP získaná z těchto výpočtů pro každé dané prostředí musí být použita pro posuzování rizika v úrovni II A.

Pokud se předpokládá zvýšené přetrvání v půdě ($D_{90} > \text{jeden rok}$) při koncentracích vyšších než 10 g/kg půdy při ustáleném stavu, může být nutné posouzení v úrovni fáze II.B

b) Následně musí být určeny hladiny, které mají vážné krátkodobé nežádoucí účinky pro různé trofické hladiny v daném životním prostředí (půda, voda). Tyto testy musí být v souladu s pokynem OECD6) nebo s analogickými osvědčenými pokyny. Žádoucí testy pro suchozemské prostředí zahrnují: toxicitu pro dešťovky (létální dávka 50 % LD50) fytotoxicitu (účinná koncentrace 50 %, ÚK50) pro suchozemské rostliny, účinky na půdní mikroorganismy (například: ÚK50 pro účinky na metagenезi a vazbu dusíku). Pro vodní prostředí: ryby, studie LD50 96 hodin; *Daphnia magna*, studie LD50 za 48 hodin; řasy, studie ÚK50 a studie toxicity pro sedimentační organismy.

c) Musí být určena hodnota PKBÚ (předpokládaná koncentrace bez účinku) pro každé dané prostředí. Získá se tak, že se vezme nejnižší zjištělá hodnota (tj. výsledek u nejcitlivějšího druhu), kdy byl pozorován nežádoucí účinek při výše uvedených testech na ekotoxicitu, a vydělí se faktorem bezpečnosti minimálně 100, v závislosti na ukazateli a počtu užitých testovaných druhů.

d) Vypočítané hodnoty PKŽP a PKBÚ se musí porovnat. Přijatelný poměr mezi PKŽP a PKBÚ bude záviset na povaze výsledku testu použitého pro určení PKBÚ. Běžně se bude pohybovat v rozmezí mezi 1 a 0,1. Pokud budou získány průkazně nižší poměry, je málo pravděpodobné, že budou nutné další ekotoxické testy, kromě případu, že se předpokládá bioakumulace. Na druhé straně vyšší poměry budou vyžadovat určité testy ve fázi II B.

4.5.2.2. Fáze II B (podrobnější toxikologické zkoušky)

U doplňkových látek, u nichž po posouzení ve fázi II A zůstávají pochyby o vlivu na životní prostředí, je nutné provést podrobnější zkoušky o jejich účincích na biologické druhy v daném(-ých) prostředí, kde zkoušky fáze II A naznačovaly možné problémy: V tomto případě se požadují další testy, aby se určily chronické a specifitější účinky na vhodných živočišných, rostlinných a mikrobiálních druzích. Je možné, že při posuzování ve fázi II A byla PKŽP nadhodnocena. Aby se tato skutečnost prokázala může být nezbytné provést měření koncentrací prostředí a persistence doplňkové látky, nebo jejich hlavních metabolitů v provozních podmínkách. Vhodné dodatečné testy na ekotoxicitu jsou popsány v řadě publikací, zejména v pokynech OECD. Může se stát, že bude nutné brát v úvahu tři kategorie druhů v prostředí, zvířata, rostliny a mikroorganismy. Požaduje se pečlivý výběr těchto testů, aby bylo zajištěno, že jsou vhodné pro situaci, v níž může být doplňková látka, nebo její hlavní metabolity uvolněna a rozptýlena do prostředí.

Posouzení dopadu na suchozemské prostředí může zahrnovat:

- subletální zkoušku účinků na dešťovky, další zkoušky vlivu na půdní mikroflóru, testy fytotoxicity na škálu rostlinných druhů důležitých z ekonomického hlediska, testy zaměřené na bezobratlé živočichy na pastvinách, včetně hmyzu a volně žijících ptáků.

- Poznámka: samostatné posouzení toxicity u savců nemusí být nutné, pokud je uplatněno při testování toxicity u savců pro určení ADI (viz 4.3.1.)

Posouzení dopadu na vodní prostředí může zahrnovat:

- testování chronické toxicity na nejcitlivějších vodních organismech, uvedených ve fázi II A, to znamená: testy v prvních stádiích života ryb, reprodukční test u dafnií, 72 hodinové testy na řasách a bioakumulační studii,

- pokud není možné stanovit adekvátní bezpečnou hranici mezi PKŽP a PKBÚ, musí být stanovena účinná omezující opatření, aby se zmírnil dopad na životní prostředí.

5.

Vzor identifikačního záznamu

5.1. Identita doplňkové látky

5.1.1. Druh doplňkové látky

5.1.2. Fyzikální stav

5.1.3. Kvalitativní a kvantitativní složení

5.1.4. Metoda analýzy doplňkové látky a reziduí

5.1.5. Registrační číslo Společenství (číslo ES)

5.1.6. Balení

5.2. Specifikace týkající se aktivní látky

5.2.1. Generický název, chemický název, číslo CAS

- Generický název

- Chemický název (IUPAC)

- číslo CAS

5.2.2. Empirický vzorec

5.3. Fyzikálně chemické, technologické a biologické vlastnosti doplňkové látky

5.3.1. Stabilita doplňkové látky

5.3.2. Stabilita během přípravy premixů a krmiv

5.3.3. Stabilita během skladování premixů a krmiv

5.3.4. Jiné vlastnosti

5.4. Podmínky užití

5.4.1. Druhy nebo kategorie zvířat, maximální stáří, je-li stanoveno

5.4.2. Minimální a maximální obsah v krmivech

5.4.3. Kontraindikace, vzájemné působení (interakce)

5.4.4. Varovná upozornění

5.5. Osoba odpovědná za uvedení do oběhu

5.5.1. Jméno a příjmení

5.5.2. Adresa místa trvalého pobytu

5.5.3. Registrační číslo

5.6. Výrobce

5.6.1. Název nebo obchodní firma, sídlo a identifikační číslo, jde-li o právnickou osobu; obchodní firma, místo podnikání, identifikační číslo, jde-li o fyzickou osobu, která je podnikatelem podle zvláštního zákona

5.6.2. Jméno, popřípadě jména, příjmení a místo trvalého pobytu jde-li o fyzickou osobu

5.6.3. Schvalovací číslo nebo registrační číslo přidělené výrobnímu provozu nebo dodavateli

5.6. Datum

6.

Obnovení povolení doplňkových látek, jejichž povolení je vázáno na osobu odpovědnou za jejich uvedení do oběhu

6.1. Obecně Musí být zpracována aktualizovaná dokumentace a monografie v souladu s nejnovějšími pokyny a seznam uvádějící všechny variace každého druhu od jeho povolení pro uvedení do oběhu nebo od posledního obnovení.

Musí být potvrzeno, že monografie a dokumentace o bezpečnosti byly upraveny tak, aby zahrnovaly všechny nové informace týkající se doplňkové látky nebo které jsou po změně těchto pokynů napříště požadovány.

Musí být dodána informace o stavu povolení ve světě a o objemu prodeje.

6.2. Identita aktivní látky a doplňkové látky Musí být předložen důkaz, že doplňková látka nebyla změněna nebo upravena ve složení, čistotě nebo aktivitě ve srovnání s povolenou doplňkovou látkou. Jakákoliv změna výrobního postupu musí být oznámena.

6.3. Účinnost Musí být předložen důkaz, že doplňková látka si uchovává požadovanou účinnost v podmínkách běžných pro živočišnou výrobu v době podání žádosti o obnovení povolení. Tyto informace musí zahrnovat výčet obecně získané zkušenosti s užitím doplňkové látky a prováděný monitoring.

6.4. Mikrobiologie Zvláštní pozornost musí být věnována případnému vývoji rezistence na antimikrobiální látky při dlouhodobém užívání v praxi. Testy se musí provádět v provozních podmínkách na farmách, kde se doplňková látka užívala pravidelně během co možná nejdélejší doby. Jako testované organismy musí být zvoleny běžné střevní bakterie a výběr musí zahrnovat příslušné endogenní a exogenní gram pozitivní a gram negativní organismy.

Je-li z testů vidět změna profilu rezistence v porovnání k počátečnímu stavu, pak musí být na rezistentních bakteriích testována křížová rezistence vůči odpovídajícím antibiotikům užívaných při léčení infekčních nemocí u člověka i u zvířat. Nejdůležitější jsou antibiotika patřící do stejné skupiny jako doplňková látka, avšak test musí zahrnovat i další skupiny antibiotik.

Musí být uvedeny i výsledky příslušných monitorovacích programů.

6.5. Bezpečnost

Musí být předložen důkaz, že za současného stavu znalostí doplňková látka zůstává bezpečná pro cílové druhy, spotřebitele, osoby s ní zacházející a životní prostředí za povolených podmínek užití. Musí být předložena aktualizovaná dokumentace o bezpečnosti za období od povolení doplňkové látky pro uvedení do oběhu nebo od posledního obnovení povolení, a musí v ní být uvedeny tyto informace:

- zprávy o nežádoucích účincích, včetně neočekávaných (do té doby neznámé účinky, závažné účinky všeho druhu, zvýšený výskyt známých účinků), u cílových zvířat, osob s látkou zacházejících a životního prostředí. Zpráva o nežádoucím účinku musí obsahovat povahu účinku, počet ovlivněných individuů/organismů, výsledek, podmínky užití, posouzení příčin,

- zprávy o interakcích do té doby neznámých a křížové kontaminaci,

- údaje z monitorování reziduí, kde je to třeba,

- jakákoliv jiná informace týkající se bezpečnosti doplňkové látky

Nebudou-li dodány žádné další informace o některém z těchto faktorů, musí být přesně uvedeny důvody, proč tomu tak je.

7.

Nový žadatel závisející na prvním povolení doplňkové látky, které je vázáno na osobu odpovědnou za její uvedení do oběhu

Poněvadž posouzení na základě údajů dodaných pro prvotní povolení může být považováno za spolehlivé, je nezbytné, aby dokumentace připravená pro účely žádosti splňovala pouze uvedené požadavky.

Pro tyto účely lze doplňkovou látku považovat za identickou, pokud kvalitativní a kvantitativní složení a čistota aktivních i neaktivních složek je v zásadě totožná, příprava je stejná a podmínky užití identické.

Pro tyto produkty obvykle nebude nezbytné opakovat zkoušky farmakologické, toxikologické a účinnosti a je možné podat zkrácenou žádost. Tato žádost musí obsahovat expertní zprávy.

- Musí být předloženy úplné podklady dle bodu 3 a monografie.

- Musí být uvedeny údaje ukazující, že specifická řada fyzikálních a chemických vlastností doplňkové látky se zásadně shodují s vlastnostmi vyráběného produktu.

- Musí být potvrzeno, že nové vědecké znalosti obsažené v dostupné literatuře týkající se doplňkové látky nezměnily původní posouzení účinnosti od doby povolení originální doplňkové látky pro uvedení do oběhu.

- Zvláštní pozornost musí být věnována případnému rozvoji rezistence na

antimikrobiální látky při dlouhodobém užívání aktivní látky v praxi. Testy se musí provádět v provozních podmínkách na farmách, kde se aktivní látka užívala pravidelně během co možná nejdélejší doby. Jako testované organismy musí být zvoleny běžné střevní bakterie a výběr musí zahrnovat příslušné endogenní a exogenní grampozitivní a gramnegativní organismy.

- Jestliže testy ukazují na změnu profilu rezistence v porovnání k počátečnímu stavu, pak musí být na rezistentních bakteriích testována křížová rezistence vůči odpovídajícím antibiotikům užívaným při léčení infekčních nemocí u člověka i u zvířat. Nejdůležitější jsou antibiotika patřící do stejné skupiny jako doplňková látka, avšak test musí zahrnovat i další skupiny antibiotik.

- Musí být podán důkaz, že za současného stavu vědeckých znalostí uvedených v dostupné literatuře je doplňková látka za schválených podmínek i nadále bezpečná pro cílové druhy, spotřebitele, osoby s ní zacházející a životní prostředí.

- Ochranná lhůta musí být stanovena v souladu s max. limitem reziduí (MLR).

- 1) Vázaná rezidua se rovnají reziduální frakci v tkáni, která není extrahovatelná fyzikálně chemickými nebo biologickými prostředky. Jsou výsledkem kovalentního spojení metabolitu sloučeniny s buněčnými makromolekulami.
- 2) Cílová tkáň je požitelná tkáň vybraná pro monitorování všech reziduí u cílového zvířete.
- 3) Pro stanovení ochranné lhůty je minimální navrhovaný počet zdravých zvířat, z nichž budou odebrány vzorky při každé porážce nebo v časovém úseku, tento:
 - dojnice osm, včetně zvířat v druhé a dalších laktacích (čtyři zvířata s vysokou užitkovostí na počátku laktace a čtyři se slabou užitkovostí v poslední fázi laktace),
 - ostatní velká zvířata: čtyři v jednom vzorku,
 - drůbež: šest v jednom vzorku,
 - snášková drůbež: deset vajec v každém bodu měření,
 - ryby: deset v jednom vzorku.
- 4) Navrhovaný výpočet : [500g masa (složeného ze 300 g svalů, 100 g jater, 50 g ledvin, 50 g tuku) nebo 500 g drůbeže (složené ze 300 g svalů, 100 g jater, 10 g ledvin, 90 g tuku) nebo 300 g ryb] + 1500 g mléka + 100 g vajec.
- 5) Pokyny OECD pro testování chemikálií

Část II. B

Biologické zkoušení mikroorganismů a enzymů

Pro mikroorganismy a enzymy platí část I.A a následující doplňky a změny:

1.

Aktivní substancí může být pouze mikroorganismus nebo enzymatický preparát chemicky stanovitelný.

2.

Identita, vlastnosti a podmínky užití doplňkové látky; kontrolní metody

2.1. Specifikace týkající se aktivní substance

U mikroorganismů se uvede:

název a taxonomický popis podle mezinárodního nomenklatorického kodexu. K determinaci mohou být použity jiné mezinárodně uznávané klasifikační příručky, např. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Yeasts, a taxonomic study (Lodder a Kreger van Rijn, Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (Hawksworth, Sutton a Ainsworth), the Genus Aspergillus (Raper a Fennel);

název a místo sbírek kultur schválených mezinárodním deponičním orgánem v tomto oboru. U deponovaného kmene se uvede sbírkové číslo, genové úpravy a všechny důležité identifikační znaky. Dále se uvede : původ, příslušné morfologické a fyziologické vlastnosti, vývojová stadia, závažné faktory týkající se biologické aktivity jako doplňkové látky a jiné genetické identifikační údaje. Počet jednotek tvořících kolonie (CFU) na 1 gram.

U enzymů se uvede:

označení podle hlavních enzymových aktivit ve smyslu požadavků IUB/IUPAC, European Inventory of Existing Commercial Substances (EINECS) a CAS Number;

biologický původ (u mikrobiálního původu: název a místo sbírky kultur schválené mezinárodním deponičním orgánem, ve které je kmen pod příslušným číslem přechováván, dále se uvedou genové úpravy a všechny důležité identifikační vlastnosti, a to včetně genetických údajů), aktivity týkající se chemicky čistých modelových substrátů a další fyzikální a chemické vlastnosti.

Ve všech případech musí být připojena kopie o příjmu deponovaného mikroorganismu označeného názvem a taxonomickým popisem podle mezinárodních nomenklaturních pravidel.

2.2. Důležité vlastnosti

U mikroorganismů: závazné identifikační vlastnosti a předpokládané využití, například vegetativní nebo sporulující forma, CFU na 1 gram.

U enzymů: optimální hodnoty pH, optimální teplota (-y) a další vhodné vlastnosti.

2.3. Stabilita

U mikroorganismů: pokles biologické aktivity (např. životnost).

U enzymových přípravků: podrobnosti o přítomnosti neočekávaných reakčních produktů vznikajících při enzymových či chemických reakcích enzymového přípravku při skladování krmných směsí.

2.4. Ostatní důležité vlastnosti

U mikroorganismů a enzymů vyhodnocení odolnosti k poklesu nebo ztrátě biologické účinnosti v trávicím traktu (in vivo) nebo za modelových podmínek (in vitro).

2.5. Navržené dávkování v premixech a krmných směsích se vyjadřuje v: příslušných jednotkách biologické aktivity, např. v CFU na gram produktu u mikroorganismů nebo v jednotkách účinnosti u enzymových přípravků.

2.6. Kontrolní metody

U mikroorganismů oficiální metody detekce, vyhodnocování, identifikace a odpovídající tržní ukazatele.

3.

Zkoušky týkající se účinnosti doplňkové látky

3.1. U mikroorganismů vznik křížové kontaminace s mikroorganismy přítomnými v krmivu.

4.

Zkoušky týkající se bezpečnosti užití doplňkové látky

Pro mikroorganismy a enzymy nejsou závazné testy: akutní toxicity, subchronické toxicity (u enzymových přípravků mikrobiálního původu stačí test perorálního toxicity na hlodavcích v délce 90 dnů), chronické toxicity a karcinogenity.

4.1. U těchto organismů, které jsou rezistentní vůči léčebným antibiotikům nutno objasnit genetický základ rezistence.

4.2. Pokud je aktivní substancí mikroorganismus, je nutno stanovit, je-li rezistentní k antibiotikům.

4.3. Pokud aktivní substanci (např. enzymové přípravky) vytváří mikroorganismus, je nutno stanovit odpovídající počet živých mikroorganismů.

4.4. U enzymových přípravků, izolovaných z mikroorganismů, se běžně požadují následující testy:

a) test genových mutací bakterií,

b) test chromozomálních aberací (přednostně in vitro).

Pokud možno, mají se toxikologické testy uskutečňovat s použitím šarže přečištěného finálního fermentačního produktu, a to před přidáním nosičů, ředidel nebo jiných látek.

Závazně se uskutečňují v souladu se všemi metodickými postupy uznávaných mezinárodních vědeckých ústavů. Účinky látek bílkovinné povahy nebo aktivit enzymových přípravků, sledované na buněčné úrovni, zvláště testy in vitro, lze vyhodnocovat modifikovanými standardními metodami. Tyto odchylky lze přijmout tehdy, pokud jsou podloženy odpovídajícími argumenty.

Při testaci se mají objasnit nesespecifické toxické reakce a prokázat genotoxické účinky. Zobecněné specifikace a skupinový test umožňují v produktu stanovit spolehlivě definované a specifické toxiny i neznámé toxické sloučeniny.

Toxikologická zpráva musí obsahovat vyčerpávající dokumentaci. Testy se provedou s materiálem, jehož charakteristiky, jako komerčního přípravku, jsou popsány v technologické části dokumentace.