

Ročník 1998

SBÍRKA ZÁKONŮ ČESKÉ REPUBLIKY

Částka 88

Rozeslána dne 10. listopadu 1998

Cena Kč 104,-

O B S A H:

251. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví, kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

251

VYHLÁŠKA

Ministerstva zdravotnictví

ze dne 16. října 1998,

kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

Ministerstvo zdravotnictví stanoví podle § 4 odst. 1 písm. c) zákona č. 157/1998 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů:

§ 1

Tato vyhláška stanoví metody pro zjišťování nebezpečných vlastností chemických látek a chemických přípravků vysoce toxických, toxických, zdraví škodlivých, žíravých, dráždivých, senzibilizujících, karcinogenních, mutagenních a toxických pro reprodukci (dále jen „toxicita chemických látek a přípravků“).¹⁾

§ 2

(1) Toxicita chemických látek a přípravků se zjiš-

tuje zkouškami prováděnými metodami uvedenými v příloze této vyhlášky.

(2) Ke zjišťování toxicity chemických látek a přípravků lze použít i jiné metody, pokud jsou přinejmenším stejně citlivé, přesné a reprodukovatelné jako metody uvedené v odstavci 1, přednostně však metody bez použití pokusných zvířat²⁾ a metody doporučené Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD).³⁾

§ 3

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem 1. ledna 1999.

Ministr:

MUDr. David, CSc. v. r.

¹⁾ § 2 odst. 8 písm. f) až n) zákona č. 157/1998 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů.

²⁾ Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění zákonů č. 162/1993 Sb., č. 193/1994 Sb., č. 243/1997 Sb. a č. 30/1998 Sb.

³⁾ Směrnice Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj pro zkoušení chemikálií. Oddíl 4 – vliv na zdraví (OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 4 – Health Effects).

Metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků

B.1. AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ (PER OS)

1. METODA

1.1 Princip testovací metody

Testovaná látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat orálně sondou, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Zvolené dávky je možno stanovit podle výsledků orientačního testu. Registrují se pozorované účinky a uhynutí. Zvířata, která uhynou během pokusu, i zvířata, která přežijí konec pokusu, se pitvají. Tato metoda se používá především při pokusech na hlodavcích.

Zvířata se závažnými a přetrvávajícími příznaky stresu a bolesti je třeba humánním způsobem utratit. Testované látky se nesmějí podávat v takových dávkách a takovým způsobem, o kterých je známo, že vyvolávají značnou bolest a stres následkem svých leptavých nebo dráždivých vlastností.

1.2 Popis metody

1.2.1 Příprava

Nejméně 5 dní před testem jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před testem se zdravá mladá dospělá zvířata náhodně přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin.

Pokud je třeba, připraví se roztok nebo suspenze testované látky ve vhodném vehikulu. Doporučuje se jako první uvážit použití vodného roztoku, další volbou je roztok v rostlinném oleji, teprve potom jako další možnost roztok v jiných vhodných vehikulích nebo suspenze. U nevodných vehikulí musí být známy nebo určeny před testem nebo během něho jejich relevantní toxikologické vlastnosti. U hlodavců by objem neměl normálně překročit 10 ml.kg^{-1} tělesné hmotnosti; výjimkou jsou vodné roztoky, jichž je možno podávat až 20 ml.kg^{-1} . Variabilita objemů látky podávané v testech by se měla minimalizovat takovou úpravou koncentrací, aby se zajistil konstantní objem na všech hladinách dávek. Současně je třeba zvolit vhodnou koncentraci látky ve vehikulu tak, aby bylo minimalizováno lokální dráždivé působení.

1.2.2 Experimentální podmínky

1.2.2.1 Pokusná zvířata

Dává se přednost potkanům, pokud nejsou známy důvody proti tomu. Je třeba používat mladých zdravých zvířat z běžně užívaných pokusných kmenů. Na začátku

testu by u obou pohlaví nemělo variační rozpětí hmotnosti zvířat (pro každé pohlaví zvlášť) překročit $\pm 20\%$ střední hodnoty.

1.2.2.2 Počet a pohlaví

Pro každou hladinu dávek použít nejméně 5 hlodavců stejného pohlaví. Používá-li se samic, musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud je k dispozici informace, že jedno z obou pohlaví je výrazně citlivější, je třeba používat zvířata tohoto pohlaví.

Poznámka: Používají-li se v akutních testech toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, mělo by se zvážit použití menšího počtu zvířat. Dávky je třeba pečlivě zvolit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxické dávky. V takových testech je třeba se vyvarovat podání letálních dávek testované látky.

1.2.2.3 Volba dávek

Má být dostatečný počet hladin dávek, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány tak, aby byl u testovacích skupin viditelný rozsah toxických účinků a mortality. Získané údaje musí stačit na znázornění vztahu mezi dávkou a účinkem, a pokud je to možné, musí umožnit stanovení LD₅₀ s přijatelnou spolehlivostí.

1.2.2.4 Limitní test

S použitím hlodavců lze provést limitní test jednou dávkou nejméně 2000 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti na skupinách 5 samců a 5 samic s použitím výše popsanych postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

1.2.2.5 Doba pozorování

Doba pozorování by měla činit nejméně 14 dní. Nelze ji však stanovit rigorózně. Měla by být určena podle obrazu otravy, rychlosti vývoje otravy a trvání fáze zotavení. Doba pozorování je možno podle potřeby prodloužit. Důležitá je doba, kdy se projevy otravy objeví a vymizí, a doba do uhynutí, zvláště tam, kde je patrná tendence k zpožděné mortalitě.

1.2.3 Popis postupu

Před podáním testované látky mají být zvířata hladová. Potkanům se potrava odebere večer před testem. U zvířat s vyšší rychlostí látkové výměny postačí kratší hladovění; přístup k pitné vodě není omezen. V den pokusu se zvířata zváží a testovaná látka se podá sondou orálně v jedné dávce. Není-li možno podat dávku najednou, lze podat aplikovanou dávku po menších množstvích během nejvýše 24 hodin. Po podání dávky je třeba zamezit přístupu k potravě ještě 3 - 4 hodiny. Podává-li se látka frakcionovaně během určitého období, může být žádoucí - podle délky tohoto období - potravu a vodu zvířatům poskytnout.

Po podání látky se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky, pro každé zvíře se vedou samostatné záznamy. Během prvního dne je třeba provádět častá pozorování. Je nezbytné sledovat a zaznamenat místní účinek aplikované látky a bezprostřední reakci zvířat na aplikaci.

Nejméně jednou během každého pracovního dne je třeba provádět pečlivá klinická vyšetření. Jiná pozorování se provádějí denně s vhodnými opatřeními k minimalizaci ztrát zvířat pro studii, např. pitva nebo zmrazení uhynulých zvířat, a izolace či usmrcení slabých nebo umírajících zvířat. Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečovým jevům, slinění, průjmu, letargii, spánku a komatu. Okamžik uhynutí je třeba zaznamenat co nejpřesněji.

Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežijí až do konce pokusu, se pitvají. Všechny patologické nálezy se zaznamenávají. Je-li to indikováno, odeberou se tkáně pro histologické vyšetření.

1.2.4 Hodnocení toxicity u druhého pohlaví

Po dokončení pokusu na jednom pohlaví, podá se látka nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví s cílem zjistit, zda zvířata druhého pohlaví nejsou výrazně citlivější na testovanou látku. V jednotlivých případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata testovaného pohlaví jsou výrazně citlivější, testování na zvířatech druhého pohlaví je možno vynechat.

2. ÚDAJE

Údaje se sestavují do tabulky. Z ní musí být pro každou experimentální skupinu patrný počet z

vířat na počátku pokusu, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými projevy otravy, popis toxických účinků a pitevních nálezů. Stanovení hmotnosti jednotlivých zvířat se provede bezprostředně před podáním testované látky, pak v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přežívají-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na stres a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolané touto látkou. LD₅₀ se vypočte uznávanou metodou. Vyhodnocení údajů by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat testované látce a výskytem a stupněm všech abnormalit včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxických účinků.

3. ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

3.1 Zpráva o průběhu pokusu

Zpráva o průběhu pokusu má pokud možno obsahovat tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, potrava atd.,
- experimentální podmínky,
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- pohlaví zvířat,
- tabelárně údaje o odpovědích podle pohlaví a podle hladiny dávek (počet uhynulých zvířat, počet zvířat s projevy otravy, počet exponovaných zvířat),