

ZÁKLADNÍ A ROZŠÍŘENÁ SADA TESTŮ

ZÁKLADNÍ (skříninková) sada testů

- A-1A.** Test na reverzní mutace na *Salmonella typhimurium* (ev. **A-1B.** fluktuální verze)
- A-2.** SOS chromotest na *Escherichia coli*
- B-1.** Test na chromozomové aberace *in vitro* u savců
- B-2.** Mikrojaderný test *in vivo* na savcích
- B-3.** Test na genové mutace *in vitro* na savcích buněčných kulturách
- B-4.** Test na recesivně letální mutace vázané na pohlaví u *Drosophila melanogaster*
- C-2.** Test na genové mutace na *Tradescantia*

V případě testů chemických látek
farmaceutických produktů
potravinových aditiv
obalových materiálů
kosmetických přípravků
aditiv krmiv
pesticidů použít:

A-1A, B-1, B-2, B-3

V případě testů prostředí *in situ*
vzorků prostředí
provozoven
záření použít:

A-2, B-1, B-2, B-4, C-2

ROZŠÍŘENÁ (doplňková) sada testů

- B-5.** Test na sesterské chromatidové výměny *in vitro* (SCE)
- B-6.** Test na neprogramovanou syntézu DNA *in vitro* (USD)
- B-7.** Test na somatické mutace a rekombinace na *Drosophila melanogaster* (SMART)
- B-8.** Test na mutace v pohlavních buňkách
- B-9.** Test na karcinogenitu - dlouhodobá studie na hlodavcích
- C-1.** Test na chromozomové aberace a sesterské chromatidové výměny u *Vicia faba*
- C-3.** Test na letální embryonální mutace u na *Arabidopsis thaliana*
- D** Molekulárně-genetické testy ve specifickém lokuse (transgenní organizmy, FISH, PCR, SSCP, DGGE, RFLP)

V případě testů chemických látek
farmaceutických produktů
potravinových aditiv
obalových materiálů
kosmetických přípravků
aditiv krmiv
pesticidů použít:

B-5, B-6, B-7, B-8, B-9, D

V případě testů prostředí *in situ*
vzorků prostředí
provozoven
záření použít:

B-5, B-6, B-7, B-8, C-1, C-3, D

POPIS BATERIÍ TESTŮ DOPORUČENÝCH K TESTOVÁNÍ GENOTOXICITY U JEDNOTLIVÝCH SUBSTANCÍ

A. Nové chemické látky

Základní hladina: produkce 0,1-1 tuna/rok, **povinný 1 test**

A-1 Test na reverzní mutace na *Salmonella typhimurium* nebo

A-2 SOS chromotest na *Escherichia coli*

V případě pozitivního výsledku pokračovat jako v hladině 0.

Hladina 0: produkce 1-10 tun/rok, **povinné 2 testy**

1. viz. **základní hladina**

2. B-2 Mikrojaderný test *in vivo* na savcích nebo

B-1 Test na chromozomové aberace *in vitro* u savců

V případě pozitivního výsledku pokračovat jako v hladině 1.

Hladina 1: produkce 10-1000 tun/rok, **povinné 4 testy**

1. a 2. viz. **hladina 0**

3. B-3 Genové mutace *in vitro* na savčích buněčných kulturách

4. B-5 Test na sesterské chromatidové výměny *in vitro* nebo

B-6 Test na neprogramovanou syntézu DNA *in vitro* nebo

B-8 Test na mutace v pohlavních buňkách

D Molekulárně-genetické testy ve specifickém lokuse

V případě pozitivního výsledku pokračovat testem na karcinogenitu.

Hladina 2: produkce více jak 1000 tun/rok, **povinné 4 testy a test na karcinogenitu**

1. až 4. viz. **hladina 1**

B-9 Test na karcinogenitu-dlouhodobá studie na hlodavcích

Rozhodnutí: **A.** Pozitivní test na karcinogenitu – zákaz výroby nebo zvýšená ochrana před stykem s člověkem

B. Pozitivní výsledek u A-1 (A-2) a současně B-2 (B-1) a současně B-5 (B-6)(D), negativní výsledek testu na karcinogenitu – zvýšená ochrana před stykem s člověkem

C. Pozitivní výsledek u A-1 (A-2) a současně B-2 (B-1), v ostatních testech nemutagenní a nekarcinogenní – zamezit běžnému styku s člověkem

B. Farmaceutické produkty, potravinové aditiva, obalové materiály, kosmetické přípravky, aditiva krmiv a pesticidy

Společná baterie testů sestává z následujících úrovní:

Genové mutace u prokaryot:

A-1 Test na reverzní mutace na *Salmonella typhimurium*

A-2 SOS chromotest na *Escherichia coli*

Chromozomové aberace:

B-1 Test na chromozomové aberace *in vitro* u savců

B-2 Mikrojaderný test *in vivo* na savcích

Genové mutace u eukaryot:

B-3 Genové mutace *in vitro* na savčích buněčných kulturách

Speciální efekty:

B-5 Test na sesterské chromatidové výměny *in vitro*

B-6 Test na neprogramovanou syntézu DNA *in vitro*

B-8 Test na mutace v pohlavních buňkách

B-9 Test na karcinogenitu - dlouhodobá studie u savců

D Molekulárně-genetické testy ve specifickém lokuse

Farmaceutické výrobky a potravinové aditiva: Povinné použití alespoň jednoho testu na všech 4 úrovních.

Obalové materiály a aditiva krmiv: Povinné použití alespoň jednoho testu na prvních 3 úrovních.

Kosmetické přípravky: Povinné použití alespoň jednoho testu na prvních 2 úrovních.

Pesticidy (proteiny produkováné rostlinami, biocidy): povinné použití vždy jednoho testu z prvních 3 úrovní.

C. Sledování prostředí in situ, vzorky prostředí, testování provozoven s nebezpečnými látkami a záření

O použití jednotlivých testů následující baterie rozhoduje také znalost charakteru a množství výskytu nebezpečných látek ve sledované lokalitě.

Genové mutace u prokaryot:

A-2 SOS chromotest na *Escherichia coli*

Chromozomové aberace:

B-1 Test na chromozomové aberace *in vitro* u savců nebo

B-2 Mikrojaderný test *in vivo* na savcích

Genové mutace u eukaryot:

B-3 Genové mutace *in vitro* na savčích buněčných kulturách

B-4 Test na recesivně letální mutace vázané na pohlaví u *D. melanogaster*

C-2 Test na genové mutace u *Tradescantia*

Speciální efekty:

B-5 Test na sesterské chromatidové výměny *in vitro*

B-6 Test na neprogramovanou syntézu DNA *in vitro*

B-7 Test na somatické mutace a rekombinace u *D. melanogaster*

B-8 Test na mutace v pohlavních buňkách

C-1 Test na chromozomové aberace a sesterské chromatidové výměny u *Vicia faba*

C-3 Test na letální embryonální mutace u *Arabidopsis thaliana*

D Molekulárně-genetické testy ve specifickém lokuse

ROZHODNUTÍ O DALŠÍM NAKLÁDÁNÍ S TESTOVANOU SUBSTANCÍ, LEGISLATIVNÍ NAŘÍZENÍ

Rozhodnutí o použití, omezení či zákazu používání testované substance se řídí dle následujících kritérií:

Nové chemické látky nebo látky, které nebyly na genotoxicitu testovány: řídí se Zákonem o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů 157/1998 a vyhlášky 250/98 registrujícím chemické látky, 251/1998 kterou se stanoví metody pro zjišťování toxicity chemických látek a přípravků, 299/98 o fyzikálně-chemických vlastnostech chemických látek, 301 a 302/98, kterými se stanoví seznam chemických látek a chemických přípravků, jejichž výroba, uvádění na trh a používání je omezeno, 306/98 o postupu hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí

- 4. EKOTOXICITA
 - 4.1 Toxicita pro ryby
 - 4.2 Toxicita pro dafnie a ostatní vodní bezobratlé
 - 4.3 Toxicita pro řasy
 - 4.4 Toxicita pro bakterie
 - 4.5 Toxicita pro suchozemské organismy
 - 4.6 Toxicita pro půdní organismy

dále 384/2001 o nakládání s polychlorovanými bifenyly (PCB), polychlorovanými terfenyly, monometyltetrachlordifenylmetanem, monometyldichlordifenylmetanem, monometyldibromdifenylmetanem a veškerými směsmi obsahujícími kteroukoliv z těchto látek v koncentraci větší než 50 mg/kg (o nakládání s PCB), 408/2000 o ochraně zdraví před neionizujícím zářením a zákonem o odpadech 185/2001.

Farmaceutické přípravky: řídí se dle Commission Directive 91/507/EEC, 87/18/EEC, 88/320/EEC, guideline III/3824/92, a podle The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products CPMP/ICH/140/ 95, CPMP/ICH/141/ 95, CPMP/ICH/299/95, CPMP/ICH/366/96.

Potravinové aditiva: řídí se dle zákona 110/1997 a vyhlášky 273/97 o potravinových aditivech nově i 54/5002, 292/97 o balené vodě, 294/97 o mikroorganizmech v potravinách, 295/97 o hygieně potravin, 298/97 o chemických látkách v potravinách, 322/99 o residuích v potravinách, 374/2000 o GMO potravinách, 379/2000 o pitné vodě a 38/2001 o obalových materiálech potravin a 53/2002 o doplňcích potravin. Zákon je tvořen dle doporučení JECFA (Join Experts Commission on Food Aditives) pro země EU.

Obalové materiály: řídí se dle hygienických směrnic zákona 20/1966 o péči a zdraví lidu, svazek 32/1970 a vyhláškou 38/2001 o obalových materiálech potravin.

Aditiva v krmivech: řídí se zákonem o krmivech 160/1996, vyhláškou 298/98 o veterinárních léčivech a biologicky aktivních látkách.

Kosmetické výrobky: řídí se dle hygienických směrnic zákona 20/1966 o péči a zdraví lidu, svazku 32/1970 a vyhlášky 26/2001.

Pesticidy: řídí se zákonem 147/1996 Sb. o podmínkách registrace nových látek na ochranu rostlin, prováděcího předpisu vyhlášky 84/1997 Sb., přílohy 1. Zákon je tvořen dle doporučení Commission Directive EU 91/414/EEC v požadavcích I. A II.

Sledování lokalit *in situ*, vzorky prostředí, pracovní místa a provozovny s toxickými chemickými látkami, záření: V případě pozitivních výsledků testů musí vycházet doporučení k regulaci a omezení zdroje znečištění a musí následovat epidemiologická studie u lidí. Ta se řídí dle hygienických směrnic zákona 20/1966 o péči a zdraví lidu, svazek 32/1970, 89/2001 o biologických expozičních testech a vyhláškou 178/2001 o ochraně zdraví při pracovní činnosti.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Kriteria pro klasifikaci mutagenů

Kategorie 1. Substance známé jako mutageny u člověka, kde existuje dostatečné množství údajů pro potvrzení kausálního vztahu mezi lidskou expozicí a dědičným genetickým poškozením. Je požadován důkaz z epidemiologických studií u lidí.

Kategorie 2. Substance, které mohou být pokládány za mutagenní u člověka, kde existuje dostatečné množství údajů k potvrzení předpokladu, že expozice lidí sledované substanci může mít za následek dědičné genetické poškození. Všeobecně lze substanci do této kategorie zařadit na základě přiměřených studií u živočichů a dalších relevantních informací.

Kategorie 3. Substance, které jsou příčinou možných mutagenních vlivů na člověka, ale o kterých nejsou věrohodné informace demonstrující dědičné genetické poškození.

Kriteria pro klasifikaci karcinogenů

Skupina 1. Substance potvrzené jako karcinogeny u člověka.

Skupina 2A. Substance pravděpodobně karcinogenní pro člověka

Skupina 2B. Možné karcinogeny u člověka.

V každé ze skupiny 1., 2A a 2B je nutné, aby 80-90% karcinogenů bylo identifikováno jako genotoxické u krátkodobých testů.

Skupina 3. Substance, o kterých existuje omezené množství údajů o karcinogenitě u zvířat.

Skupina negenotoxicky působících karcinogenů. Negativní ve standardních testech genotoxicity (nereaguje přímo s DNA), ale působící negenotoxickými mechanizmy karcinogeneze.

Korelace výsledků krátkodobých testů genotoxicity s karcinogenitou

Na základě výsledků krátkodobých testů genotoxicity lze predikovat možný karcinogenní účinek sledované substance. Odhady takového stanovení se liší od 90% k 54% (Ashby, 1985; Tennant, 1987; Zeiger, 1987; Carere a kol., 1995). Jako rychlý systém pro odhad karcinogenity jsou doporučeny transgenní organismy (Yamamoto a kol., 1997).

PŘÍKLADY POUŽÍVANÝCH BATERIÍ TESTŮ GENOTOXICITY V RŮZNÝCH ZEMÍCH

UK (1989):

etapa 1. 2 testy *in vitro*:

- genové mutace u bakterií
- klastogenicitu na savčích kulturách

etapa 2 (u látek pozitivních v etapě 1). 2 testy na somatické tkáni:

- chromozomové aberace v kostní dřeni savců
- DNA poškození v jiných orgánech (játra)

etapa 3 (v případě, že je potvrzeno riziko tvorby gametických mutací). Následuje kaskáda 3 testů na gametické mutace:

- dominantně letální test ve spermatogoniích, dále v případě positivity
- test na reciproké translokace u myši nebo na nondisjunkce (10-ti denní), dále v případě positivity
- kvantitativní test na dědičné efekty u myši (dědičné translokace, specifické lokusy)

Itálie (1989):

etapa 1. 4 testy *in vitro*:

- **genové mutace u bakterií**
- **genové mutace u eukaryont**
- **chromozomové aberace u savčích kultur**
- **DNA poškození/reparační testy (USD, SCE)**

etapa 2. (u látek pozitivních v etapě 1):

- ***in vivo* test na somatické a/nebo gametické mutace**

etapa 3. (v případě, že je potvrzeno riziko tvorby gametických mutací). Kaskáda 3 testů na gametické mutace:

- **kvantitativní test na dědičné efekty (dědičné translokace, specifické lokusy)**

V případě malého rizika expozice chemickou látkou jsou doporučeny 2 *in vitro* testy:

- **genové mutace u bakterií**
- **chromozomové aberace v savčích buňkách**

U.S. EPA (1990):

Iniciační baterie požadovaná pro testování mutagenity

etapa 1.:

- test na reverzní mutace u *Salmonella*

etapa 2.:

- test na genové mutace u myších buněčných kultur (lymfatické buňky L5178Y, nebo CHO AS52 nebo V79)
- *in vitro* test na chromozomové aberace u savců

etapa 3.:

- *in vivo* test na chromozomální efekty (chromozomové aberace v kostní dřeni savců nebo test na mikrojádra)

V případě potvrzení výsledků iniciační baterie se dále testuje specifitějšími testy:

- kvantitativní a/nebo kvalitativní testy na potvrzení rizika dědičných mutací
- dlouhodobá studie karcinogenity

Japonsko (1993):

etapa 1.:

- **genové mutace u bakterií**

etapa 2. (u látek pozitivních v etapě 1.):

- ***in vivo* test na chromozomové aberace**

V případě positivity se konstatuje, že chemikálie je nebezpečná pro člověka.