



Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Merkblatt Nr. 33

2. Auflage

September 1975

Unterlagen zur Toxikologie eines Pflanzenbehandlungsmittels im Rahmen des Zulassungsverfahrens

Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes

in Zusammenarbeit mit dem Toxikologischen Ausschuß des
Industrieverbandes Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel e. V.

Allgemein

Die toxikologischen Versuche müssen in jeder Hinsicht unter definierten bzw. standardisierten Bedingungen dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis entsprechend durchgeführt werden. Sie sollen möglichst viele toxikologische Kriterien erfassen. Größter Wert ist auf die Objektivierung, übersichtliche Dokumentation und statistische Bearbeitung der Befunde zu legen. Der Zulassungsbehörde ist Einsicht in die Originalunterlagen zu ermöglichen. Werden fremde Versuchsergebnisse angeführt, so sind dem Antrag Kopien der zitierten Original-Literatur beizufügen. Soweit der Antragsteller die Notwendigkeit von Spezialuntersuchungen vorhersieht, sollte er diese von sich aus so bald als möglich durchführen. In Zweifelsfällen sollte sich der Antragsteller mit dem Bundesgesundheitsamt in Verbindung setzen.

Über Einzelheiten der Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung muß der verantwortliche Toxikologe entscheiden. Hinweise sind in der Mitteilung VIII (Kriterien zur toxikologischen Bewertung von Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmitteln) vom 26. Juli 1974 der entsprechenden Kommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, enthalten.

Einige Gesichtspunkte sollen nachstehend hervorgehoben werden: Es sollen möglichst genaue Angaben über die Versuchstiere (wie Tierhalter, Tierstamm, Gewicht, Herkunft, Angaben zur Fütterung und Zucht) und Methoden gemacht werden. Bei Ermittlung der akuten Toxizität sollen sich die geschlechtsreifen Tiere in der ersten Lebenshälfte befinden; die Bestimmung soll mindestens an einer Tierart für männliche und weibliche Tiere gesondert durchgeführt werden. Fütterungsversuche sollen in der Regel mit Tieren beiderlei Geschlechts, die sich in der intensiven Wachstumsphase befinden, beginnen. Die gleichzeitige Untersuchung entsprechender Kontrolltiere in ausreichender Zahl ist Voraussetzung. Versuche an landwirtschaftlichen Nutztieren sind nach Möglichkeit von ausgebildeten Veterinärtoxikologen oder Toxikologen unter Beratung durch einen Tierarzt durchzuführen.

Nachstehend wird unterschieden zwischen den *vorrangig erforderlichen Unterlagen* (1) den Punkten D - 1.1 bis D - 1.5 und den *Unterlagen* zu D - 2.1 bis D - 2.6, die je nach den Ergebnissen der vorgenannten Untersuchungen (1) oder der chemischen Struktur des Wirkstoffes sowie seiner Abbau- und Reaktionsprodukte *erforderlich werden können* (2). Die Unterlagen zu D - 1.4 (90-Tage-Fütterungsversuch) sind immer erforderlich, wenn der Einsatz des Mittels in Kulturen erfolgen soll, die zur Verwendung als Lebensmittel oder Futtermittel geeignet sind oder wenn es beim Einsatz eines Mittels in anderen Anwendungsgebieten nicht auszuschließen ist, daß Rückstände ins Trinkwasser gelangen können. Die Unterlagen zu D - 1.5 (Untersuchung an landwirtschaftlichen Nutztieren) sind immer erforderlich, wenn das Mittel zur Behandlung von Futterpflanzen (z. B. Futtergetreide, Kulturen des Feldfutterbaus, Grünland) angewendet werden kann. Die unter 2 genannten Unterlagen können auch dann notwendig werden, wenn die unter 1 eingereichten obligatorischen Unterlagen nur eine kurzfristige Zulassung erlaubten. Unter Umständen sind in die toxikologischen Untersuchungen auch die wesentlichen Abbau- und Reaktionsprodukte des Wirkstoffes einzubeziehen. *Die unter 3 zu D - 3.1 bis D - 3.2 genannten Angaben sind in jedem Fall erforderlich.*

1 Vorrangig erforderliche Unterlagen

D-1.1 *Akute Toxizität des technischen Wirkstoffes*

Bei Ermittlung der akuten Toxizität ist an der Ratte bei oraler und intraperitonealer Verabreichung die LD₅₀ mit dem 95 %-Vertrauensbereich und dem Slope-Faktor zu bestimmen. Eine orientierende Toxizitätsbestimmung (ALD) an mehreren üblichen Labortierarten ist der exakten LD₅₀ an lediglich *einer* zweiten Tierart vorzuziehen.

Die systemische dermale Toxizität (24 h-Exposition) und die Inhalationstoxizität (4 h-Exposition) sind dann an Ratten zu bestimmen, wenn eine Einwirkung unter methodisch sinnvollen Versuchsbedingungen möglich erscheint.

Die lokale Reizwirkung an der intakten und skarifizierten Haut von Kaninchen und am Kaninchenauge ist unter Verwendung eines nach dem gegenwärtigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand gültigen Bestimmungsschlüssels festzustellen.

Zu jedem Versuchsergebnis gehört unbedingt eine genaue Beschreibung des Vergiftungsbildes – möglichst in Form einer Check-Liste – bis zum Ende der Nachbeobachtungsperiode.

Die akute Toxizität an Fischen ist gemäß den Angaben zu D - 2.4 zu ermitteln.

D-1.2 *Angaben über die Wirkungen auf den Menschen*

Diese Angaben sind dringend erforderlich, um eine hygienisch-toxikologische Bewertung, die sich in der Regel auf Tierversuche stützen muß, in sinnvoller Weise zu relativieren. Es sollte klar sein, daß ein Stoff nicht deshalb aus der öffentlichen Kontrolle entlassen werden kann, weil er die Stadien der toxikologischen Prüfung passiert hat.

Unter dem Begriff „Versuch“ ist hier die gezielte medizinische Überwachung eines Personenkreises zu verstehen, der unter möglichst definierten Expositionsbedingungen Kontakt mit dem Biozid hat. Die innerbetrieblichen Erfahrungen mit einem Wirkstoff werden durch die laufende arbeitsmedizinische Betreuung gewonnen. Durch die Fülle der Kontaktmöglichkeiten (Labor, Wirkstoffproduktion, Formulierung, Abpackung etc.) ist der Personenkreis größer und das Spektrum der individuellen Reaktionen breiter. Es interessieren Reaktionen jeglicher Art, angefangen von Reizwirkungen und Sensibilisierungserscheinungen bis zu systemischen Auswirkungen oder rein subjektiven Beschwerden. Dabei muß im Einzelfall der Zusammenhang mit der Pestizidexposition nicht unbedingt als gesichert gelten. Diese Aussagen sind möglichst zu ergänzen durch Beschreibung der Sicherheitsvorkehrungen, unter denen jeweils gearbeitet wird, oder durch repräsentative Messungen der Arbeitsplatz-Konzentrationen. Verantwortlich für die Richtigkeit der Angaben ist der Werksarzt oder der Sicherheitsbeauftragte des Betriebes (vgl. hierzu Gesetz über Betriebsärzte, Sicherheitsingenieure und andere Fachkräfte für Arbeitssicherheit, in Kraft getreten am 1.12.1974). Gleichzeitig wird erwartet, daß Beanstandungen eines Mittels hinsichtlich der Verträglichkeit, die dem Antragsteller aus Kreisen der Anwender mitgeteilt werden, den Zulassungsbehörden zur Kenntnis gegeben werden.

Es ist in jedem Fall unmaßgeblich, ob bei besonderen Beobachtungen vorgeschriebene Sicherheitsmaßnahmen eingehalten wurden oder nicht, da es allein darauf ankommt, zu erfassen, wie ein Pflanzenbehandlungsmittel auf den Menschen wirken kann.

Diese nachträgliche Überwachung eines Mittels ist ein *laufender* Vorgang, wobei besondere Vorkommnisse den Zulassungsbehörden *unverzüglich* mitzuteilen sind.

D - 1.3 *Die kumulativ-toxische Wirkung des technischen Wirkstoffes*

Die Ermittlung der Dosis-Wirkung-Zeit-Beziehung der subakuten Dosis wird in der Regel in einer speziellen Untersuchung durchgeführt werden müssen. Die Dosierungen sind so zu wählen, daß bei mindestens einer Dosisgruppe deutliche Symptome einer Schädigung auftreten. Für die Wahl der zu untersuchenden Parameter gelten dieselben Maßstäbe wie im chronischen Fütterungsversuch. Die Applikationsdauer sollte 4 Wochen nicht überschreiten. Dieser Versuch, der mit dem Wirkstoff bzw. der Wirkstoffkombination durchgeführt wird, ist gesondert im Hinblick auf den möglichen Vergiftungsmechanismus und auf Gefahren bei der Anwendung zu diskutieren.

D - 1.4 *90-Tage-Fütterungsversuch*

Zur Bestimmung der Dosis ohne Wirkung (no-effect-level) werden in der Regel 3 – 4 verschiedene Dosierungen des technischen Wirkstoffs an einer für eine statistische Auswertung ausreichende Anzahl sowohl männlicher als auch weiblicher entwöhnter Ratten ad libitum verfüttert. Beurteilt werden: Futtraufnahme, Körpergewichtsentwicklung, Verhaltensweisen, Mortalität, Laboratoriumsuntersuchungen (hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen sowie Organfunktionsprüfungen und Urinuntersuchungen) während des Versuchs und bei Versuchsende, Obduktionsbefunde mit Organgewichtsbestimmungen und histologische Untersuchung der Tierorgane. Auch über die Reversibilität der Auswirkungen müssen Befunde erhoben werden.

Entsprechende Untersuchungen sind mit Hunden oder ggf. mit einem anderen Nichtnager durchzuführen. Auf Vor- und Verlaufsuntersuchungen ist hierbei besonderer Wert zu legen. Bei der Nichtnagerspezies kann in der Regel auf die Prüfung der Reversibilität verzichtet werden.

D - 1.5 *Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren*

Bei direkter Behandlung von Futterpflanzen oder Anwendung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Nichtkulturland und im Forst muß die mögliche gesundheitliche Gefährdung landwirtschaftlicher Nutztiere und freilebender Tiere, die ungehinderten Zugang zu behandelten Arealen haben, kalkulierbar sein. Da Wiederkäuer und Geflügel keine üblichen Laboratoriumstiere darstellen, sollten auch Untersuchungen mit diesen Tierspezies eingepplant werden.

Bei Anwendung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Futterpflanzen ist unter Berücksichtigung der Rückstandssituation mindestens an einer exponierten Tierespezies, für die die behandelten Futtermittel einen erheblichen Teil der täglichen Fütteration ausmachen können, eine Verträglichkeitsprüfung durchzuführen.

Bei diesen Versuchen sollten mindestens zwei Wirkstoffkonzentrationen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe getestet werden. Gesichtspunkte für die Wahl der zu testenden Konzentrationen sind u. a.: Rückstände zum Zeitpunkt oder einen Tag nach der Ausbringung (zur Feststellung einer möglichen Gefährdung solcher Tiere, die ungehinderten Zugang zu behandelten Arealen haben), no-effect-level aus Untersuchungen an Labortieren, beantragter Toleranzwert bzw. ein Mehrfaches davon.

Bei dem Versuch sind mindestens zu beobachten: Allgemeinverhalten der Tiere, Futterraufnahme, Gewichtsverlauf, Blutbild, Urinalysen und für Leberschäden charakteristische Reaktionen. Nach Beendigung des Versuches sind die Tiere in begründeten Fällen pathologisch-anatomisch und pathologisch-histologisch zu untersuchen.

Ist der Antragsteller aufgrund von Untersuchungsergebnissen an Labortieren der Ansicht, daß solche Versuche nicht erforderlich sind, sollte eine Abstimmung mit dem Bundesgesundheitsamt vorgenommen werden. Das Bundesgesundheitsamt behält sich in diesen Fällen die Entscheidung über die Notwendigkeit der Durchführung von Versuchen an landwirtschaftlichen Nutztieren vor.

2 Unterlagen, die erforderlich werden können

D - 2.1

2.2 *Fütterungsversuche über längere Zeiträume*

Langzeitfütterungsversuche (2-Jahres-Fütterungsversuche an Ratten und entsprechend verwertbare Versuche an einer weiteren Tierart) werden in der Regel erforderlich, wenn für das Pflanzenbehandlungsmittel eine längerfristige Zulassung gewünscht wird. Sie sollten im gleichen Rahmen wie der 90-Tage-Fütterungsversuch durchgeführt werden. Doch sollte die Tierzahl der einzelnen Dosierungsgruppen entsprechend größer gewählt werden, damit der zeitliche Ablauf der Auswirkungen (Dosis-Wirkung-Zeit-Beziehung), der wesentlicher Inhalt der chronischen Toxizitätsuntersuchung ist, durch zwischenzeitliche Entnahme von Tieren ermittelt werden kann. Derartige Versuche können auch Hinweise auf eine mögliche cancerogene Wirkung geben.

D - 2.3 *Stoffwechselversuche*

Zur toxikologischen Beurteilung von Pflanzenbehandlungsmitteln gehören auch Kenntnisse über das Schicksal der betreffenden Stoffe im tierischen Organismus.

Um Informationen über eine mögliche Anreicherung des Wirkstoffes und/oder seiner Metaboliten zu erhalten, sind orientierende Bilanzuntersuchungen an Versuchstieren möglichst mit radioaktiv markierten Wirkstoffen durchzuführen. Derartige Versuche sollten in einem möglichst frühen Stadium der toxikologischen Prüfung durchgeführt werden.

In speziellen Fällen sind außerdem Daten über Resorption, Verteilung auf Organe und Gewebe, Metabolisierung und Ausscheidung in Abhängigkeit von Dosis und Verabreichungsdauer zu ermitteln. Damit können genauere Aussagen über eine mögliche Anreicherung und die Art der gebildeten Metaboliten sowie Hinweise für die Auswahl geeigneter Versuchstierarten, den Einsatz spezieller Untersuchungsmethoden und die Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen gewonnen werden.

Bei Anreicherung des Wirkstoffes und/oder seiner Metaboliten im Organismus von Versuchstieren oder bei verzögerter Ausscheidung sind darüber hinaus auch Bilanzuntersuchungen mit solchen landwirtschaftlichen Nutztieren durchzuführen, für die rückstandshaltige Futtermittel in Betracht kommen. Dabei ist auch ein möglicher Übergang des Wirkstoffes und/oder seiner Metaboliten in von Tieren stammenden Lebensmitteln, wie Eier und Milch zu prüfen.

D - 2.4 *Auswirkungen auf Fische*

Für die Beurteilung der Wirkung eines Pflanzenbehandlungsmittels sind Angaben über die Fischgiftigkeit unerlässlich für alle Wirkstoffe (gegebenenfalls Präparate), die im Freien zur Anwendung gelangen. Ausgenommen sind solche Präparate, die als Saatbeizen oder in geschlossenen Räumen (Treibhäuser, Mühlen, Silos usw.) verwendet werden.

Für alle im Freien zur Anwendung gelangenden Wirkstoffe (gegebenenfalls Präparate) ist die LC_{50} (96 Std.) unbedingt an Regenbogenforellensetzlingen und an 1-sömmrigen Karpfen zu ermitteln.

Für Regenbogenforellensetzlinge (je Gruppe mindestens 10 Tiere) sollten pro Fisch bei einer Gesamtlänge von 3 – 8 cm 3 – 8 l Wasser verwendet werden. Die Wassertemperatur soll für Regenbogenforellen $16^{\circ} \pm 1,5^{\circ} \text{C}$ betragen. Der Sauerstoffgehalt des Wassers soll über 7 mg/l liegen und vor und während des Versuches in gleichmäßiger Menge zugeführt werden; dabei soll der Sauerstoffgehalt in mg/l vor, während und nach dem Versuch ermittelt und angegeben werden (der Sauerstoff ist maÑanalytisch oder mit Sauerstoffsonde zu bestimmen).

Für 1-sömmrige Karpfen mit einer Länge zwischen 3 – 8 cm (gleichfalls je Gruppe mindestens 10 Tiere) richtet sich die Wassermenge nach den oben angegebenen Werten. Die Wassertemperatur soll hierbei $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ betragen, der Sauerstoffgehalt soll über 7 mg/l O_2 liegen. Er soll wie oben vor, während und nach dem Versuch ermittelt und angegeben werden.

Der pH-Wert sollte bei den Fischversuchen zwischen 6,5 – 8 liegen. Der Calciumionengehalt sollte nicht mehr als $2,2 \pm 0,5 \text{ mmol/l}$ und der Magnesiumionengehalt nicht mehr als $0,6 \pm 0,1 \text{ mmol/l}$ betragen.

Bei allen Fischversuchen soll ein Kontrollbecken ohne Fischbesatz vorhanden sein, in dem die gleichen Bedingungen hinsichtlich der Belüftung, der Wassertemperatur, des pH-Wertes und der Wasserhärte herrschen und in dem eine Wirkstoffkonzentration von 1 ppm eingesetzt wird. Die Wirkstoffkonzentration ist in dem Kontrollbecken und in den Versuchsbecken nach 2, 48 und 96 Stunden zu ermitteln.

Bei den o. g. Versuchen ist auf toxische Symptome zu achten (Schwimmverhalten, Färbung, äußerliche Veränderungen wie Glotzaugen, Mortalität).

Für Mittel, die an und in Gewässern angewendet werden, sind unter Berücksichtigung einer möglichen Anreicherung über die Nahrungskette Untersuchungen über Rückstände des Wirkstoffes und/oder seiner Abbau- und Reaktionsprodukte in Nutzfischen vorzunehmen.

Außerdem sind in zwei Teichen Untersuchungen a) in der Anwendungskonzentration des Präparates, b) ohne Pflanzenbehandlungsmittel (Kontrollgruppe) über einen Zeitraum von 9 Monaten durchzuführen. Dabei sind Karpfen und/oder Regenbogenforellensetzlinge auszusetzen. Der Abbau des Pflanzenbehandlungsmittels im Wasser ist monatlich zu untersuchen. Nach Beendigung des Versuches sind aus jedem Versuchsteich 20 Fische einer pathologisch-histologischen Untersuchung zuzuführen.

Dabei sind folgende Organe zu untersuchen: Kiemen, Haut, Muskulatur, Leber, Niere, Darm, Pankreas, Milz, Herz, Rückenmark, Gehirn, Gonaden und Augen.

In der dem Präparat beiliegenden Gebrauchsanweisung ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, daß dieses Mittel nicht in Laichteichen und auch nicht in Teichen, die für die Laichfischproduktion vorgesehen sind, eingesetzt werden darf. Soll dieser Zusatz unterbleiben, so ist an je 100 Karpfen- und Forellensetzlingen ein 3-Generations-Reproduktionstest durchzuführen, der gleichfalls in Versuchsteichen stattfinden sollte.

D - 2.5 *Spezielle Untersuchungen*

Hierunter fallen z. B. Generationsversuche, Untersuchungen über die Sensibilisierung, über die Neurotoxizität, über Kombinationswirkungen, cancerogene, teratogene und mutagene Wirkung. Diese Untersuchungen sind dann durchzuführen, wenn Wirkstoffe oder Beistoffe aufgrund ihrer Gruppencharakteristik oder aus sonstigen Gründen die eine oder andere Wirkung vermuten oder eine Abklärung erforderlich erscheinen lassen.

D - 2.6 *Akute Toxizität des Handelspräparates*

Die Ermittlung der akuten oralen, inhalatorischen, perkutanen und dermalen Toxizität der Wirkstoffzubereitung wird erforderlich, wenn durch die Art der Formulierung wesentlich veränderte Resorptionsbedingungen gegenüber dem Test auf Toxizität des Wirkstoffes zu erwarten sind, oder wenn bei Kombinationspräparaten auch bei Verwendung von Beistoffen keine Voraussagen über die toxische Wirkung der Stoffkombination möglich sind. Die Notwendigkeit, Untersuchungen zur Toxizität der Formulierung anzustellen, wird zusätzlich begrenzt durch die Menge der in ihr enthaltenen Wirkstoffe. Wenn – auf der Basis der additiven Toxizität – die theoretische LD₅₀ so hoch liegt, daß wegen der zu verabreichenden Substanzmenge keine annähernde LD₅₀-Bestimmung möglich erscheint, so sind solche Untersuchungen nicht erforderlich.

Dagegen können die Beistoffe in einer Formulierung eine wesentliche Bedeutung für die Augenreizwirkung des Präparates haben, so daß in den meisten Fällen dieser Test erforderlich ist.

Auch kann es in besonderen Ausnahmefällen erforderlich sein, daß die kumulativ-toxische Wirkung einer Wirkstoffkombination oder einer Formulierung zu testen ist.

Wenn der Antragsteller bestimmte Untersuchungen für nicht erforderlich hält, so sollte er das unter Bezug auf die Kenntnisse über Wirk- und Reizstoffe stichhaltig begründen.

3 Erforderliche zusammenfassende Beurteilung

D - 3.1 *Schlußfolgerung und toxikologische Grenzwerte*

Die Angaben sollen tabellarisch oder in Stichworten die Ergebnisse der vorangegangenen Einzelangaben enthalten.

Die zusammenfassende Beurteilung sollte im Sinne einer gutachterlichen Äußerung eines Toxikologen unter Einbeziehung aller über die Substanz bekannten toxikologischen Daten vorgenommen werden.

D - 3.2 *Toleranzvorschläge*

Hier ist anzugeben, welche Toleranzen für den Wirkstoff in den in Frage kommenden Kulturen notwendig erscheinen, nach den Ergebnissen der Untersuchungen über die chronische Toxizität und das Rückstandsverhalten. Derartige Vorschläge sind auch für Einzelfuttermittel und Weidepflanzen, unter Erläuterung der Berechnungsgrundlage, zu machen.