BD LBI 1425 22. FEB. 1984

Biologische Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft

Merkblatt Nr. 59 September 1983

VERFAHREN UND PRÜFUNGEN FÜR DIE BEURTEILUNG MÖGLICHER RISIKEN INSEKTENPATHOGENER VIREN ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL

Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Bibliothek Berlin-Dahlem

D

Vorbemerkungen

Für den Einsatz insektenpathogener Viren als Pflanzenschutzmittel gelten uneingeschränkt die Bedingungen des Pflanzenschutzgesetzes, d. h. daß die Verfahren und Prüfungen eine Beurteilung erlauben müssen, ob insektenpathogene Viren als Pflanzenschutzmittel die Gesundheit von Mensch und Tier gefährden und schädliche Auswirkungen auf die Umwelt haben. Die hierzu einzusetzenden Prüfmethoden sollen dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis entsprechen und die speziellen Risiken erfassen, die von Viren ausgehen können.

Nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis kann angenommen werden, daß zahlreiche insektenpathogene Viren, insbesondere aus der Familie der Baculoviridae, als infektiöses Agens die Gesundheit von Mensch und Wirbeltieren nicht gefährden. Zur Vermeidung jeglicher Risiken ist es jedoch notwendig, einen Forderungskatalog von Prüfungen zu definieren, der

- die Bedingungen bei Produktion und Anwendung insektenpathogener Viren bestimmt

- und Prüfungen zur Beurteilung der gesundheitlichen und umweltbezogenen Unbedenklichkeit vorschreibt.

Der Katalog von Prüfungen sollte nicht als starres Prüfmuster angesehen werden, vielmehr sollten in einer Dialogphase zwischen Antragsteller, Sachverständigen und Zulassungsbehörde die endgültige Form der Versuchsanstellung und die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen abgestimmt werden.

Der vorliegende Prüfungskatalog ist im Hinblick auf die Prüfung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln aus insektenpathogenen Viren schlechthin erstellt worden. Allerdings sind im nationalen wie internationalen Bereich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf längere Sicht Anträge auf Zulassung als Pflanzenschutzmittel nur bei Baculoviren zu erwarten, weil

...

hier die meisten Ergebnisse und Erfahrungen hinsichtlich Biologie, Tenazität (Widerstandsfähigkeit eines Mikroorganismus gegenüber äußeren Einflüssen), Wirtsspezifität usw. vorliegen. In diesen Fällen, vor allem bei den am meisten erforschten Vertretern dieser Familie, sind Erleichterungen bei den Prüfungen und Auflagen zu erwarten.

Wegen der besonderen Eigenschaften insektenpathogener Viren im Vergleich zu chemischen Wirkstoffen muß in dieser Richtlinie auch auf den Produktionsbereich und die notwendigen Qualitätskontrollen eingegangen werden. Auch müssen die Ausstattung der Produktionsstätten und die Qualifikation des Personals bestimmten Kriterien entsprechen*.

Die in Abschnitt I - Auflagen für die Virusproduktion und Anforderungen im Rahmen der Qualitätskontrolle - genannten Bedingungen sollen eine mögliche Veränderung des Virus-Wirt-Systems verhindern bzw. eine wider Erwarten eingetretene Veränderung noch vor dem Inverkehrbringen des Pflanzenschutzmittels erkennen lassen.

Als Veränderung des Virus-Wirt-Systems sind gleichermaßen Virus- und/oder Wirtsmutanten sowie eine Veränderung der Wirkungsbreite des betreffenden Virus zu verstehen. Die Umstellung des Produktionssystems auf ein Wirtssystem, das höhere Virusausbeuten erlaubt, ist damit nicht grundsätzlich ausgeschlossen. Darüber hinaus sollen durch die genannten Bedingungen die Stabilität derartiger Virus-Wirt-Systeme sowie Kontamination mit Fremdviren kontrolliert werden.

Die Untersuchungen zur gesundheitlichen Risikoabschätzung (Abschnitt II) sollen den besonderen - von chemischen Pflanzenschutzmitteln abweichenden - Eigenschaften der insektenpathogenen Viren Rechnung tragen. Wegen der zumeist fehlenden toxischen und pathogenen Eigenschaften gegenüber Säugern, Vögeln, Fischen usw. werden die üblichen Kennwerte (Schwellendosen, "no-effect-level", LD 50-Angaben) nicht zu ermitteln und Ergebnisse nur in Form von ja/nein-Aussagen verwertbar sein.

...

---

* WHO Grundregeln (GMP) Kommentar zum Fragebogen für die Überwachung pharmazeutischer Industriebetriebe, W. Oeser und R. Strohecker, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsanstalt Stuttgart, 1979.

Oder: Richtlinien für Laboratorien, Ausgabe 4, 1980, Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, Zentralstelle für Unfallverhütung und Arbeitsmedizin, Langwartweg 103, 5300 Bonn 1, Fachausschuß "Chemie".

Um der Zweckbestimmung des Pflanzenschutzgesetzes gerecht zu werden, ist es jedoch unerläßlich, auf eventuelle Auswirkungen auf Wirbeltiere und andere Nicht-Zielorganismen (bestimmte Invertebraten, z. B. Wasserorganismen) zu untersuchen, damit die Sicherheit auch auf diesem Gebiete gewährleistet ist und ggf. entsprechende Auflagen bei der Zulassung erteilt werden können.

Zur Beurteilung des Verhaltens im Boden und Wasser sollen bei insektenpathogenen Viren die gleichen oder vergleichbare Kriterien gelten wie bei der Prüfung chemischer Pflanzenschutzmittel. Hierbei sind die beiden wichtigsten substanzspezifischen Eigenschaften die Beständigkeit und die Mobilität im Boden.

Untersuchungen zum Verhalten insektenpathogener Viren in Wasser müssen in bestimmten Fällen vorgesehen werden, weil solche Informationen für die Beurteilung möglicher Auswirkungen auf Wasserorganismen und für Trinkwasserschutzfragen Bedeutung haben. Sowohl die eher toxikologisch orientierten Prüfungen an Wirbeltieren (s. Abschnitt II) und Prüfungen mit Invertebraten (s. Abschnitt III/2) als auch die Untersuchungen zum Verhalten in Boden und Wasser (s. Abschnitt IV) sind in der Regel für das jeweilige (zum Einsatz als Pflanzenschutzmittel vorgesehene) Virus wie bei den chemischen Pflanzenschutzmitteln im Vorfeld der Produktion mit einer repräsentativen Virus-Charge durchzuführen und werden daher voraussichtlich "einmalige" Prüfungen sein. Untersuchungen nur an einem repräsentativen Modellvirus werden in der Regel nicht akzeptabel sein. Im Produktionsbereich sind regelmäßige Qualitätskontrollen der Chargen unerläßlich.

Die in den Abschnitten II und IV geforderten Untersuchungen sind in der Regel mit dem unformulierten Viruspräparat im Vorfeld der Produktion durchzuführen. Entsprechendes gilt auch für die unter dem Aspekt des Gewässerschutzes (Wasserqualität) vorgesehenen Untersuchungen zur Daphnientoxizität (Abschnitt III/2). Nur in besonderen Verdachtsfällen sollte das Viruskonzentrat der laufenden Produktion nochmals untersucht werden.

Über die Toxizität der zur Herstellung des Handelspräparates verwendeten Beistoffe und Formulierungshilfsmittel sind Unterlagen vorzulegen, die eine gesundheitliche Beurteilung erlauben.

...

I. Auflagen für die Virusproduktion und Anforderungen im Rahmen der Qualitätskontrolle

Bedingungen	erforderliche Prüfungen/Maßnahmen/Angaben
1 Stamm- und Saatvirus:	
1.1 Als Ausgangsmaterial ist ein aus Insekten isoliertes Stammvirus zu verwenden	1.1 Die Kenntnis der Herkunft und Eigenschaften des Virus (Isolierung, Wirtsspektrum, Typendifferenzierung)
1.2 Saatvirus-Chargen sind ausschließlich in natürlich empfänglichen Insekten herzustellen	1.2 Nachweis der Identität jeder Saatvirus-Charge: Analyse der biochemischen und/oder serologischen Eigenschaften; Prüfung auf Konstanz der Effizienz im Biotest (LD_{50})
1.2.1 Für Virusproduktion in vivo werden bei Viren mit Einschließungskörpern diese als Saatvirus benutzt	
1.2.2 Für Virusproduktion in vitro werden bei Viren mit Einschließungskörpern nicht eingeschlossene ("ausgeschleuste") Virionen aus den Larven gewonnen und als Saatvirus benutzt	
1.3 Virusproduktion und Qualitätskontrolle Die Eigenschaften des produzierten Virus müssen der verwendeten Saatvirus-Charge entsprechen	1.3 Am Endprodukt muß eine virologische Identitätsprüfung durchgeführt werden. Es ist nachzuweisen, daß das Endprodukt frei von menschen- bzw. wirbeltierpathogenen Fremdviren ist: Es sind zwei Blindpassagen mit produziertem Virusmaterial auf menschlichen diploiden Lungenzellen sowie embryonalen Hühnerfibroblasten durchzuführen. Ggf. sollte auch eine permanente Fischzellinie (z.B. RTG-2 von einer Salmonide) eingesetzt werden

Bedingungen	erforderliche Prüfungen/Maßnahmen/Angaben
	Nachweis des Freiseins von menschen- bzw. wirbeltierpathogenen Bakterien (Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus) und Bestimmung der Kontaminationsrate bzgl. Bakterien und Pilzen. Es wird empfohlen, den Fremdvirus-, Bakterien- und Pilznachweis in staatlichen Untersuchungsämtern bzw. geeigneten Speziallaboratorien ausführen zu lassen.
1.3.1 in vivo produziert: Passage im originären Wirt Die Anzahl der direkten Viruspassagen im Verlauf der Produktion, ausgehend von einer Saatvirus-Charge, darf 20 nicht überschreiten	
1.3.2 in vitro produziert: Passage in der Zellkultur Die Anzahl der direkten Viruspassagen im Verlauf der Produktion, ausgehend von einer Saatvirus-Charge, darf 20 nicht überschreiten	
2 Wirtssystem bzw. Wirtszellsystem Die für die Virusvermehrung verwendeten Wirtssysteme müssen definiert sein	
2.1 in vivo-System	2.1 taxonomische Bestimmung des Wirtes, Herkunft
2.2 in vitro-System	2.2 Es ist kontinuierlich der Nachweis der Identität der verwendeten Zellkultur zu erbringen

Bedingungen		erforderliche Prüfungen/Maßnahmen/Angaben	
3	Der Nachweis der Wirtsspezifität oder der engen Selektivität des Virus bei Invertebraten ist aus ökologischen Gründen zu erbringen		
4	Vom Antragsteller sollten regelmäßig - z. B. jährlich - Berichte über den Umfang des Einsatzes (z. B. verkaufte Menge an Viruspräparaten), Informationen über besondere Vorkommnisse wie Auswirkungen auf Anwender und Umwelt an die Zulassungsbehörde gegeben werden	4	Ergeben sich durch die Anwendung Hinweise auf unerwünschte Nebenwirkungen, kann die Zulassungsbehörde gezielte Untersuchungen (Felduntersuchungen) zur Aufklärung der Verdachtsmomente vom Antragsteller fordern

II. Toxikologische Untersuchungen an Vertebraten

Die folgenden Untersuchungen sind mit dem unformulierten Viruskonzentrat (Produktionsstandard) durchzuführen, um für den Herstellungs- und Anwenderbereich Sicherheitsmaßnahmen empfehlen zu können.

Als praxisbezogener Richtwert für die Dosierung sollte bei oraler Applikation die Aufwandmenge an Viren, die auf 0,5 ha ausgebracht wird, pro kg Körpergewicht verabreicht werden. Bei den übrigen Applikationsformen ist die Dosierung jeweils entsprechend der Durchführbarkeit der Versuche abzuändern.

1 Untersuchung an Säugern

1.1 Einfachapplikation

1.1.1 akut oral Ratte

1.1.2 akut inhalativ Ratte (4 h/Tag, 14 Tage Nachbeobachtung)

1.1.3 Hautreiztest und Augenreiztest

(Der Augenreiztest ist nicht durchzuführen, wenn ätzende oder reizende Eigenschaften im Hautreiztest nachgewiesen wurden)

1.2 Mehrfachapplikation

1.2.1 Sensibilisierungstest dermal (Meerschweinchen)

1.2.2 Sensibilisierungstest inhalativ (Meerschweinchen)

(Das Dosierungsschema soll dem dermalen Sensibilisierungstest entsprechen, wobei die Konzentrationen den realistischen Expositionsgrößen bei der Anwendung anzugleichen sind)

1.3 Prüfung auf mutagene Wirkungen

1.3.1 cytogenetische Untersuchungen an Säugerzellen in vitro

1.4 Langzeituntersuchungen

einschließlich der Prüfung auf mögliche karzinogene Wirkung werden zunächst nicht als unbedingt erforderlich angesehen. Das gleiche gilt für Untersuchungen zur Teratogenität und Reproduktion. Die vorliegenden Kenntnisse hierzu sind auszuwerten und in eine gesundheitliche Bewertung aufzunehmen.

2 Untersuchungen an Vögeln

2.1 Einfachapplikation

oral, 1 vorzugsweise insektenfressende Art

...

2.2 ggf. Mehrfachapplikation

2.3 ggf. oral: Applikation virusinfizierter Insektenlarven

3 Untersuchungen an Fischen

3.1 Es sind Untersuchungen an 2 Fischarten durchzuführen (z. B. eine Salmoniden- und eine Cyprinidenart)

4 ggf. Untersuchungen an anderen Vertebraten

III. Untersuchungen an Invertebraten (Nicht-Ziel-Invertebraten)

Die in diesem Abschnitt aufgeführten und unter dem Gesichtspunkt ökologischer Auswirkungen geforderten Untersuchungen (zur Daphnientoxizität vgl. auch S. 3 unten) dienen der Abschätzung, inwieweit eine Beeinträchtigung der bei einem Einsatz von Viruspräparaten unbeabsichtigt getroffenen Wirbellosenfauna zu erwarten ist. Die Versuche sind daher stets mit dem fertig formulierten Produkt vorzunehmen.

In Absprache zwischen dem Antragsteller und der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik) wird im Einzelfall festgelegt, welche Untersuchungen nach den jeweiligen Erfordernissen und Möglichkeiten durchzuführen sind.

Obligatorische Untersuchungen:

1 Untersuchungen an Pollinatoren: Honigbiene; entsprechend Richtlinie Nr. 23 - 1 der Biologischen Bundesanstalt)

2 Untersuchungen an Wasserorganismen

2.1 Daphnientoxizität

Darüber hinaus können im Rahmen der Selektivitätsprüfung bei insektenpathogenen Viren weitere Untersuchungen erforderlich werden:

3 Untersuchungen an Entomophagen (Richtlinien zum Teil veröffentlicht, ansonsten bei der Biologischen Bundesanstalt erhältlich)

3.1 relevante Prädatoren (z. B. Chrysopa sp.)

3.2 relevante Parasiten (z. B. Trichogramma sp.)

...

4 Untersuchungen an Bodentieren

4.1 relevante Primärzersetzer (z. B. Regenwurm;
- Richtlinie in Vorbereitung -)

IV. Untersuchungen zur Umweltbelastung

1 Untersuchungen zum Verhalten auf dem behandelten Substrat
(Rückstandsuntersuchungen)

2 Untersuchungen zum Verhalten im Boden

2.1 Versickerungsverhalten
(entsprechend Merkblatt Nr. 37 der Biologischen Bundesanstalt)

2.2 Beständigkeit im Boden
- soweit keine stichhaltige Literatur vorliegt -

3 Untersuchungen zum Verhalten im Wasser

Bei Untersuchungen von Viren im Wasser auf Transportverhalten und Infektiosität sind die üblichen Parameter zu berücksichtigen.