

## ALLEGATO II

Requisiti del dossier da presentare ai fini dell'iscrizione di una sostanza attiva nell'elenco delle sostanze che possono essere utilizzate nei prodotti fitosanitari.

(art. 5, comma 2, lettera b)

### Introduzione

Le informazioni richieste devono:

- 1.1 comprendere un dossier tecnico che fornisca i dati necessari per valutare i prevedibili rischi, immediati o ritardati, che la sostanza può comportare per l'uomo, per gli animali e per l'ambiente, e che contenga almeno la descrizione e i risultati degli studi cui viene fatto di seguito riferimento;
  - 1.2 ove del caso, essere ottenute applicando disciplinari per le prove, nella versione più recentemente adottata, cui viene fatto riferimento o che sono descritti nel presente allegato; nel caso di studi avviati prima dell'entrata in vigore delle modifiche del presente allegato, le informazioni di cui trattasi devono essere ottenute applicando adeguati disciplinari per le prove convalidati a livello internazionale, oppure, qualora non fossero disponibili, applicando disciplinari per le prove accettati dal Ministero della sanità;
  - 1.3 se un disciplinare per le prove è inappropriato o non descritto, oppure se è stato usato un disciplinare diverso da quello cui è fatto riferimento nel presente allegato, comprendere una giustificazione della scelta del disciplinare utilizzato che possa essere accettata dal Ministero della sanità; in particolare, qualora sia fatto riferimento nel presente allegato ad un metodo comunitario consistente nella trasposizione di un metodo predisposto da un organismo internazionale (ad es. l'OCSE), può essere accettato che le informazioni richieste siano ottenute in conformità dell'ultima versione di detto metodo, se all'inizio degli studi in questione il metodo comunitario non sia ancora stato aggiornato.
  - 1.4 comprendere, ove il Ministero della sanità ne faccia richiesta, una descrizione esauriente del disciplinare usato per le prove, se non menzionato o descritto nel presente allegato, e una descrizione esauriente di qualsivoglia differenziazione metodologica, corredata di una pertinente giustificazione che possa essere accettata dal Ministero della sanità;
  - 1.5 comprendere una relazione completa e obiettiva sugli studi svolti, con descrizione esauriente degli stessi, oppure una giustificazione che possa essere accettata dal Ministero della sanità, qualora:
    - non vengano forniti dati o informazioni particolari, superflui in considerazione della natura del prodotto o dell'uso proposto dello stesso, oppure
    - non sia scientificamente necessario o tecnicamente possibile fornire dati ed informazioni;
  - 1.6 ove del caso, essere state ottenute in osservanza alle disposizioni recate dal decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116, di attuazione della direttiva 86/609/CEE del Consiglio, in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.
- 
- 2.1 Le prove e le analisi intese ad ottenere dati sulle proprietà e/o sulla sicurezza per l'uomo, gli animali o l'ambiente devono essere effettuate in osservanza ai principi di cui alla direttiva 87/18/CEE e al decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 120, allegato I, lettera D, punto 6, concernente l'applicazione dei principi di buone prassi di laboratorio.
  - 2.2 In deroga a quanto disposto al punto 2.1., le prove e le analisi intese ad ottenere dati sulle proprietà e/o sulla sicurezza delle sostanze per le api da miele e altri artropodi benefici diversi dalle api sono svolte da enti od organismi di prova ufficiali o ufficialmente

riconosciuti per l'esecuzione di tali prove o da organismi che soddisfino almeno i requisiti di cui ai punti 2.2. e 2.3 dell'introduzione dell'allegato III. Tale deroga si applica alle prove effettivamente iniziate al più tardi entro il 31 dicembre 1999.

- 2.3 In deroga a quanto disposto al punto 2.1., le prove e le analisi intese ad ottenere dati sui residui, effettuate in conformità a quanto previsto alla sezione 6 del presente allegato II con prodotti fitosanitari contenenti sostanze attive già sul mercato alla data del 26 luglio 1993, devono essere svolte da enti od organismi ufficiali o ufficialmente riconosciuti per l'esecuzione di tali prove o da organismi che soddisfino almeno i requisiti di cui ai punti 2.2. e 2.3 dell'introduzione dell'allegato III. Tale deroga si applica alle prove effettivamente iniziate al più tardi entro il 31 dicembre 1997.
- 2.4 In deroga a quanto disposto al punto 2.1, per le sostanze attive costituite da microrganismi o virus, le prove e le analisi intese ad ottenere dati sulle proprietà e/o sulla sicurezza per quanto riguarda aspetti diversi dalla salute umana possono essere svolte da enti od organismi di prova ufficiali o ufficialmente riconosciuti che soddisfino almeno i requisiti di cui ai punti 2.2 e 2.3 dell'introduzione dell'allegato III.

## PARTE A DELL'ALLEGATO II

### Sostanze chimiche

#### 1. IDENTITA' DELLA SOSTANZA ATTIVA.

Le informazioni fornite devono essere sufficienti a identificare con precisione ciascuna sostanza attiva e a definirne le caratteristiche e la natura. Le informazioni e i dati in questione sono necessari per tutte le sostanze attive, salvo in caso di indicazione diversa.

##### 1.1 Richiedente (nome, indirizzo, ecc.).

Deve essere indicato il nome e l'indirizzo del richiedente (indirizzo permanente nella Comunità) nonché il nome, la qualifica, i numeri di telefono e di telefax della persona da contattare.

Inoltre, nel caso in cui il richiedente disponga di un ufficio, agenzia o rappresentanza in Italia per la richiesta di iscrizione nell'elenco delle sostanze attive che possono essere usate nei prodotti fitosanitari o nello Stato membro incaricato dalla Commissione Europea, deve essere indicato il nome e l'indirizzo dell'ufficio locale, agenzia o rappresentanza, nonché il nome, la qualifica, il numero di telefono e di telefax della persona da contattare.

##### 1.2 Fabbricante (nome, indirizzo compresa l'ubicazione dello stabilimento).

Deve essere indicato il nome e l'indirizzo del(dei) fabbricante(i) della sostanza attiva, nonché il nome e l'indirizzo di ogni stabilimento di produzione. E' necessario indicare un punto di contatto (di preferenza un punto di contatto centrale, con nome, numero di telefono e di telefax), che fornisca informazioni aggiornate e risponda ai quesiti riguardanti la tecnologia di produzione, i procedimenti di fabbricazione e la qualità del prodotto (ivi comprese, se del caso, partite singole). Nei casi in cui, a seguito dell'inserimento della sostanza attiva nell'elenco delle sostanze attive che possono essere usate nei prodotti fitosanitari, vi siano mutamenti nella sede o nel numero dei fabbricanti, le informazioni richieste devono essere nuovamente notificate alla Commissione e agli Stati membri.

##### 1.3 Nome comune proposto o accettato dall'ISO e sinonimi.

Deve essere indicato il nome comune ISO, o proposto dall'ISO e, se del caso, altri nomi comuni proposti o accettati (sinonimi), ivi compreso il nome (qualifica) dell'autorità competente in materia di nomenclatura.

##### 1.4 Nome chimico (nomenclatura IUPAC e CA).

Deve essere indicato il nome chimico secondo la corrispondente denominazione indicata nella legge 29 maggio 1974, n. 256 e successivi aggiornamenti oppure, qualora non sia ivi incluso, il nome chimico conforme alla nomenclatura IUPAC e a quella CA.

**1.5 Numero(i) del codice di sviluppo del fabbricante.**

E' necessario indicare i numeri di codice usati per identificare, durante il processo di fabbricazione, la sostanza attiva e, ove disponibili, quelli utilizzati per identificare le formulazioni che la contengono. Per ogni numero di codice, è necessario indicare il materiale a cui esso si riferisce, il periodo in cui è stato usato e gli Stati membri o altri paesi nei quali è stato ed è tuttora usato.

**1.6 Numeri CAS, CEE e CIPAC (se disponibili).**

E' necessario indicare gli eventuali numeri del Chemical Abstracts, quelli CEE (EINECS o ELINCS) e CIPAC.

**1.7 Formula empirica e di struttura; massa molecolare.**

E' necessario indicare la formula empirica, la massa molecolare e la formula di struttura della sostanza attiva e, se del caso, la formula di struttura di ogni stereoisomero e isomero ottico presenti nella sostanza attiva.

**1.8 Metodi di fabbricazione (schema di sintesi) della sostanza attiva.**

Per ciascuno stabilimento di produzione, è necessario indicare il metodo di fabbricazione, precisando l'identità dei materiali di partenza, la sequenza di reazioni chimiche necessarie e l'identità dei sottoprodotti e delle impurezze presenti nel prodotto finale. In genere non sono necessarie informazioni sulla meccanica del procedimento.

Nei casi in cui le informazioni disponibili si riferiscano a un sistema di produzione pilota, esse dovranno essere nuovamente fornite una volta che siano stati definiti i metodi ed i procedimenti di produzione su scala industriale.

**1.9 Specificazione della purezza della sostanza attiva in g/kg.**

E' necessario indicare il tenore minimo, in g/kg, della sostanza attiva pura (esclusi gli isomeri inattivi) presente nel materiale usato per la fabbricazione di prodotti formulati. Nei casi in cui le informazioni disponibili fornite si riferiscano ad un sistema di produzione pilota, esse dovranno essere nuovamente fornite alla Commissione e agli Stati membri una volta che siano stati definiti metodi e procedimenti di produzione su scala industriale. Ciò vale se il cambiamento del sistema di produzione si traduce in una diversa specificazione della purezza.

**1.10 Identità degli isomeri, impurezze e additivi (ad es., agenti stabilizzanti), con relativa formula di struttura e tenore espresso in g/kg.**

E' necessario indicare il tenore massimo, in g/kg, degli isomeri inattivi, nonché, eventualmente, il rapporto tra il tenore di isomeri e quello di diastereoisomeri. Deve essere inoltre indicato il tenore massimo, in g/kg, di ogni additivo e di ogni componente diverso dagli additivi, ivi compresi i sottoprodotti e le impurezze.

Per **ogni componente**, presente in quantitativi di almeno 1 g/kg, è necessario fornire le seguenti informazioni, se del caso:

- nome chimico (nomenclatura IUPAC e CA);
- nome comune ISO, o proposto dall'ISO, se disponibile;
- numeri CAS, CEE (EINECS o ELINCS) e CIPAC, se disponibili;
- formula empirica e di struttura;
- massa molecolare;
- tenore massimo in g/kg.

Se dal procedimento di fabbricazione possono derivare **impurezze e sottoprodotti** nella sostanza attiva particolarmente indesiderabili dal punto di vista tossicologico, ecotossicologico o ambientale è necessario determinare e indicare il tenore di ciascuna di queste sostanze. In tali casi, è necessario indicare i metodi d'analisi usati e i limiti di determinazione, che devono essere sufficientemente bassi per ciascuna delle sostanze non desiderate.

Inoltre, è necessario fornire, all'occorrenza, le seguenti informazioni:

- nome chimico (nomenclatura IUPAC e CA);
- nome comune ISO, o proposto dall'ISO, se disponibile;
- numeri CAS, CEE (EINECS o ELINCS) e CIPAC, se disponibili;
- formula empirica e di struttura;
- massa molecolare;
- tenore massimo in g/kg.

Nei casi in cui le informazioni disponibili si riferiscano a un sistema di produzione pilota, esse dovranno essere nuovamente fornite una volta che siano stati definiti i metodi ed i procedimenti di produzione su scala industriale. Ciò vale se il cambiamento del sistema di produzione si traduce in una diversa specificazione della purezza.

Se le informazioni fornite non bastano a identificare un componente, specialmente i condensati, è necessario fornire dettagli circa la composizione di ciascuno di questi componenti.

E' necessario indicare altresì il nome commerciale degli **additivi** eventualmente aggiunti alla sostanza attiva, prima della fabbricazione del prodotto formulato, per proteggerne la stabilità e facilitarne la manipolazione. Per siffatti additivi sono indispensabili le seguenti informazioni, se del caso:

- nome chimico (nomenclatura IUPAC e CA);
- nome comune ISO, o proposto dall'ISO, se disponibile;
- numeri CAS, CEE (EINECS o ELINCS) e CIPAC, se disponibili;
- formula empirica e di struttura;
- massa molecolare;
- tenore massimo in g/kg.

Di questi additivi che vengono aggiunti e che sono diversi dalla sostanza attiva e dalle impurezze derivanti dal procedimento di fabbricazione, è necessario indicare la funzione:

antischiuma, tampone, antigelo, emulsionante, legante, stabilizzante, altri (specificare).

#### 1.11 **Profilo analitico delle partite.**

Campioni rappresentativi della sostanza attiva devono essere opportunamente analizzati per quanto si riferisce al tenore di sostanza attiva pura, isomeri inattivi, impurezze e additivi. I risultati analitici devono comprendere il tenore, espresso in g/kg, di tutti i componenti presenti in quantitativi superiori a 1 g/kg e che tipicamente dovrebbe costituire almeno il 98% del materiale analizzato. Deve essere determinato il tenore effettivo di componenti particolarmente indesiderabili a causa delle loro proprietà tossicologiche, ecotossicologiche o dannose per l'ambiente. I dati indicati devono comprendere i risultati dell'analisi di campioni singoli e un riassunto, onde mettere in evidenza il tenore minimo o massimo e quello tipico di ogni componente che interessa.

Qualora la sostanza attiva sia prodotta in impianti differenti, tali informazioni devono essere specificate diversamente per ciascuno di tali impianti.

Inoltre, se del caso e ove possibile, devono essere analizzati campioni della sostanza attiva prodotti su scala di laboratorio o in sistemi di produzione pilota, se tale materiale è stato utilizzato per ottenere dati tossicologici o ecotossicologici.

## 2. PROPRIETA' FISICHE E CHIMICHE DELLA SOSTANZA ATTIVA

- i) Devono essere descritte le proprietà fisiche e chimiche delle sostanze attive che, assieme ad altre informazioni adeguate, serviranno a caratterizzare dette sostanze. In particolare, le informazioni fornite devono consentire:
- l'identificazione dei rischi di tipo fisico, chimico e tecnico connessi alle sostanze attive;
  - la classificazione delle sostanze attive rispetto ai rischi;
  - la scelta delle limitazioni e condizioni da rispettare ai fini dell'inserimento nell'allegato I;
  - la definizione di adeguati avvertimenti in materia di rischi e di sicurezza.

Le informazioni e i dati in questione sono necessari per tutte le sostanze attive, salvo in caso di indicazione diversa.

- ii) Le informazioni fornite, ivi comprese quelle riguardanti i preparati, devono consentire l'identificazione dei rischi di tipo fisico, chimico e tecnico connessi ai preparati stessi, la classificazione di detti preparati e la conclusione che essi possono essere usati senza inutili difficoltà. Essi devono essere tali da ridurre al minimo l'esposizione dell'uomo, degli animali e dell'ambiente nelle condizioni di impiego previste.
- iii) Deve essere determinata la conformità delle sostanze attive per le quali è richiesto l'iscrizione nell'Allegato I alle rispettive specifiche FAO. Eventuali divergenze dalle specifiche FAO devono essere dettagliate e giustificate.
- iv) Talvolta è necessario eseguire prove usando sostanze attive di specifica già stabilita; in questi casi devono essere riferiti i principi del metodo (o dei metodi) di purificazione. E' necessario indicare la purezza del materiale di prova, che deve essere al miglior livello tecnologico ottenibile. Se il grado di purezza ottenuto è inferiore a 980 g/kg, è necessario giustificarne adeguatamente i motivi. Da tale motivazione deve risultare che sono state esperite tutte le vie tecnicamente possibili e prospettabili di produzione della sostanza attiva pura.

### 2.1 Punto di fusione e punto di ebollizione.

- 2.1.1 Il punto di fusione, oppure quello di congelamento o di solidificazione della sostanza attiva pura, devono essere definiti conformemente al metodo CEE A 1. Devono essere effettuate misurazioni fino a 360° C.
- 2.1.2 Se del caso, il punto di ebollizione di sostanze attive liquide pure deve essere definito conformemente al metodo CEE A 2. Devono essere effettuate misurazioni fino a 360° C.
- 2.1.3 Se il punto di fusione e/o di ebollizione non possono essere determinati per motivi di decomposizione o di sublimazione, è necessario indicare la temperatura alla quale ha luogo detta decomposizione o sublimazione.

## 2.2 **Densità relativa.**

La densità relativa di sostanze attive, liquide o solide, pure deve essere definita conformemente al metodo CEE A 3.

## 2.3 **Tensione di vapore (in Pa), volatilità (ad es., costante della legge di Henry).**

2.3.1 Deve essere indicata la tensione di vapore della sostanza attiva pura, determinata conformemente al metodo CEE A 4. Se la tensione di vapore è inferiore a  $10^{-5}$  Pa, la tensione di vapore a 20°C o 25°C può essere stimata sulla base di una curva della tensione di vapore

2.3.2 In caso di sostanze attive solide o liquide, la volatilità (costante della legge di Henry) della sostanza attiva pura deve essere dedotta o calcolata dalla sua solubilità in acqua e dalla tensione di vapore ed essere espressa in  $\text{Pa} \times \text{m}^3 \times \text{mol}^{-1}$ .

## 2.4 **Aspetto (stato fisico, colore e odore, se noti).**

2.4.1 Devono essere descritti l'eventuale colore e lo stato fisico della sostanza attiva tecnica e di quella pura.

2.4.2 La stessa cosa vale per eventuali odori della sostanza attiva tecnica o di quella pura che fossero osservati durante la manipolazione dei materiali nei laboratorio o negli stabilimenti di produzione.

## 2.5 **Spettro di assorbimento (UV/VIS, IR, NMR, MS), estinzione molare e relative lunghezze d'onda.**

2.5.1 E' necessario determinare i seguenti spettri, aggiungendo una tabella di interpretazioni dei simboli: Ultravioletto/Visibile (UV/VIS), infrarosso (IR), risonanza magnetica nucleare (NMR) e spettrometria di massa (MS) della sostanza attiva pura ed estinzione molare alle rispettive lunghezze d'onda. Occorre determinare ed indicare le lunghezze d'onda di estinzione molare UV/VIS nonché, se del caso, la lunghezza d'onda corrispondente al valore più elevato di assorbimento al di sopra di 290 nm. In caso di sostanze attive isomeri ottici, è necessario misurare la purezza ottica.

2.5.2 Devono essere determinati e indicati gli spettri di assorbimento UV/VIS, IR, NMR e MS di tutte le impurezze ritenute importanti dal punto di vista tossicologico, ecotossicologico ed ambientale.

## 2.6 **Solubilità in acqua compresi gli effetti del pH (da 4 a 10) sulla solubilità.**

Deve essere indicata la solubilità in acqua delle sostanze attive pure a 20°C a pressione atmosferica, determinata con i metodi CEE A 6.

Queste determinazioni della solubilità in acqua devono essere effettuate in ambiente neutro (cioè in acqua distillata in equilibrio con l'anidride carbonica atmosferica). Nei casi in cui la sostanza attiva sia capace di formare ioni, le determinazioni devono essere effettuate altresì in ambiente acido (pH da 4 a 6) ed alcalino (pH da 8 a 10). Se la

stabilità della sostanza attiva in ambiente acquoso non consente di determinare la solubilità in acqua, è necessario giustificarlo in base ai dati della prova.

## 2.7 Solubilità nei solventi organici.

E' necessario determinare la solubilità delle sostanze attive tecniche nei seguenti solventi organici a temperature comprese tra 15 e 25°C se detta solubilità è inferiore a 250 g/kg; deve essere specificata la temperatura della prova:

- Idrocarburo alifatico: di preferenza n-eptano;
- Idrocarburo aromatico: di preferenza xilene;
- Idrocarburo alogenato: di preferenza 1,2-dicloroetano;
- Alcole: di preferenza metanolo o alcole isopropilico;
- Chetone: di preferenza acetone;
- Estere: di preferenza acetato di etile.

Se uno o più di questi solventi non sono adatti ad una data sostanza attiva (ad esempio reagiscono con il materiale di prova), possono essere usati solventi alternativi. In tal caso la scelta deve essere giustificata in termini di struttura e polarità.

## 2.8 Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua, compresi gli effetti del pH (da 4 a 10).

Deve essere indicato il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua della sostanza attiva pura, determinato con il metodo CEE A 8. Deve essere studiato l'effetto del pH (da 4 a 10) se la sostanza risulta acida o basica in base al suo valore pKa (< 12 per gli acidi, > 2 per le basi).

## 2.9 Stabilità in acqua, tasso di idrolisi, degradazione fotochimica, quantità e identità dei prodotti di degradazione, costante di dissociazione a diversi pH (da 4 a 9)

2.9.1 I tassi di idrolisi delle sostanze attive pure (di solito sostanza attiva radiomarcata, purezza > 95%), per ciascuno dei valori pH 4, 7 e 9, in condizioni di sterilità, in assenza di luce, devono essere determinate con il metodo CEE C 7. Per le sostanze aventi un basso tasso di idrolisi, detto tasso può essere determinato a 50° C o ad altra temperatura opportuna.

Se la degradazione viene osservata a 50°C, il tasso di degradazione deve essere determinato a un'altra temperatura ed è necessario costruire un diagramma di Arrhenius per poter stimare l'idrolisi a 20°C. E' necessario indicare l'identità dei prodotti di idrolisi formati, la costante di velocità di reazione osservata ed il valore costante DT 50.

2.9.2 Per composti aventi un coefficiente di assorbimento molare (decadico) ( $\epsilon$ ) > 10 ( $1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) ad una lunghezza d'onda  $\lambda$  maggiore o uguale a 290 nm, è necessario indicare la fototrasformazione diretta in acqua purificata (ad esempio distillata) ad una temperatura compresa tra 20°C a 25°C, della sostanza attiva purificata, di solito radiomarcata usando luce artificiale in condizione di sterilità, se necessario utilizzando un solubilizzante. Sostanze sensibilizzanti quale l'acetone non devono essere usate come co-solvente o solubilizzante. La fonte luminosa deve simulare la luce del sole ed essere provvista di filtri che escludano radiazioni a lunghezza d'onda  $\lambda$  maggiore o uguale a 290 nm.

E' necessario indicare l'identità dei prodotti di disintegrazione che si formano in qualsiasi fase dello studio in quantitativi = a 10% della sostanza attiva aggiunta, un bilancio di massa in ragione di almeno il 90% della radioattività applicata, nonché il semiperiodo di vita fotochimica.

2.9.3 Nel caso in cui sia necessario studiare la fototrasformazione diretta, è necessario determinare e indicare il rendimento quantico costante della fotodegradazione diretta in acqua, calcolando congiuntamente altresì il semiperiodo teorico di vita della sostanza attiva nello strato superficiale dei sistemi acquosi e il periodo di vita effettivo della sostanza. Il relativo metodo è descritto in "FAO Revised Guidelines of Environmental criteria for the Registration of Pesticides".

2.9.4 Se si verifica la dissociazione in acqua, la ( $\epsilon$ ) costante ( $i$ ) di dissociazione (valori pKa) delle sostanze attive pure, deve (devono) essere conformi alla prova "OECD Test Guideline 112". E' necessario identificare le specie dissociate formatesi, basandosi su considerazioni teoriche. Se la sostanza attiva è un sale, è necessario indicarne il valore pKa.

## 2.10 **Stabilità all'aria, degradazione fotochimica, identità del(dei) prodotto(i) di degradazione.**

E' necessario presentare una valutazione della degradazione fotochimica ossidativa (fototrasformazione indiretta) della sostanza o delle sostanze attive.

## 2.11 **Infiammabilità, compresa l'autoinfiammabilità.**

2.11.1 L'infiammabilità delle sostanze attive tecniche, siano esse solide, gassose oppure sostanze che sviluppano gas ad elevata infiammabilità deve essere definita conformemente al metodo CEE A 10, A 11 o A 12, a seconda dei casi.

2.11.2 L'autoinfiammabilità delle sostanze attive tecniche deve essere determinata conformemente al metodo CEE A 15 o A 16 e/o, se necessario, alla prova "UN-Bowes-Cameron-Cage-Test" (UN-Raccomandazioni sul Trasporto delle Merci Pericolosi, capitolo 14, Nr. 14.3.4).

## 2.12 **Punto di infiammabilità.**

Il punto di infiammabilità delle sostanze attive tecniche con un punto di fusione al di sotto dei 40°C deve essere definito conformemente al metodo CEE A 9; sono ammessi unicamente metodi "a contenitore chiuso".

## 2.13 **Proprietà esplosive.**

Per le sostanze attive tecniche, le proprietà esplosive devono essere definite conformemente al metodo CEE A 14.

## 2.14 **Tensione superficiale.**

La tensione superficiale deve essere definita conformemente al metodo CEE A 5.

## 2.15 **Proprietà ossidanti.**

Le proprietà ossidanti delle sostanze attive tecniche devono essere definite conformemente al metodo CEE A 17, salvo nei casi in cui dall'esame della formula di struttura risulti con una certa sicurezza che la sostanza attiva è incapace di reazioni esotermiche con materiale combustibile; in quest'ultimo caso questa informazione è sufficiente a giustificare la mancata determinazione delle proprietà ossidanti della sostanza.

### 3. ALTRE INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA ATTIVA

- i) E' necessario precisare le finalità, la dose e le modalità d'impiego effettive o proposte dei preparati contenenti la sostanza attiva.
- ii) Le informazioni fornite devono specificare i normali metodi e le normali precauzioni di manipolazione, conservazione e trasporto della sostanza attiva.
- iii) Gli studi, i dati e le informazioni presentati, con il supporto di altri rilevanti studi, dati ed informazioni connessi, devono specificare e giustificare i metodi e le precauzioni da seguire in caso di incendio; devono essere previsti, sempre in caso di incendio, gli eventuali prodotti di combustione, sulla base della struttura chimica e delle proprietà fisico-chimiche della sostanza attiva.
- iv) Gli studi, i dati e le informazioni presentati, con il supporto di altri rilevanti studi, dati e informazioni, devono dimostrare l'idoneità delle misure proposte ad affrontare eventuali situazioni di emergenza.
- v) Le informazioni e i dati in questione sono necessari per tutte le sostanze attive, salvo in caso di indicazione diversa.

#### 3.1 **Attività (ad es., fungicida, diserbante, insetticida, repellente, regolatore della crescita).**

L'attività della sostanza deve essere specificata come segue:

acaricida, battericida, fungicida, diserbante, insetticida, molluschicida, nematocida, fitoregolatore, repellente, rodenticida, attività semiochimica, talpicida, viricida, altri (specificare).

#### 3.2 **Effetti sugli organismi nocivi (ad esempio veleno per contatto, per inalazione, per ingestione, micotossico o micostatico ecc.; sistemico o no nelle piante).**

3.2.1 Deve essere determinata la natura degli effetti sugli organismi nocivi:

- azione per contatto,
- azione per ingestione,
- azione per inalazione,
- azione micotossica,
- azione micostatica,
- azione essiccante,
- inibizione della riproduzione,
- altri (specificare).

3.2.2 Se del caso, è necessario stabilire se la sostanza attiva venga o meno trasferita nelle piante e se siffatto trasferimento sia apoplastico, simplastico o entrambi.

#### 3.3 **Campi di impiego considerati [ad esempio in pieno campo, in colture protette (serra), per la conservazione di prodotti vegetali, per giardinaggio domestico].**

Il campo o i campi di impiego attuali e quelli proposti per i preparati contenenti la sostanza attiva devono essere specificati scegliendoli tra i seguenti:

- uso in campo, quale agricoltura, orticoltura, silvicoltura e viticoltura;
- impiego in colture protette (serra);
- impiego in aree di svago (parchi pubblici, ecc.);
- diserbante in zone non coltivate;
- impiego in giardinaggio domestico;
- per piante da interni;
- impiego per la conservazione di prodotti vegetali;
- altro (specificare).

### 3.4 **Organismi nocivi controllati e piante o prodotti protetti o trattati.**

3.4.1 E' necessario precisare l'impiego attuale e previsto in termini di colture, gruppi di colture, vegetali o prodotti vegetali trattati e, se del caso, protetti.

3.4.2 Se del caso, è necessario precisare gli organismi nocivi sui quali agisce il prodotto.

3.4.3 Se del caso, è necessario indicare gli effetti ottenuti, ad esempio eliminazione dei germogli, ritardo nella maturazione, riduzione della lunghezza dei gambi, miglioramento della fertilizzazione ecc.

### 3.5 **Meccanismo di azione.**

3.5.1 E' necessario descrivere il meccanismo d'azione, se noto, della sostanza attiva in termini, quando rilevante, di meccanismo(i) biochimico(i) e fisiologico(i) e di vie biochimiche che intervengono. Se disponibili, devono essere riportati i risultati dei relativi studi sperimentali.

3.5.2 Se è noto che, per dare gli effetti voluti, la sostanza attiva si deve trasformare in un metabolita o in un prodotto di degradazione dopo l'applicazione o l'uso di preparati che la contengono, è necessario fornire, su detto metabolita attivo o prodotto di degradazione, le seguenti informazioni in connessione con quelle di cui ai paragrafi 5.6, 5.11, 6.1., 6.2, 6.7, 7.1, 7.2 e 9:

- nome chimico (nomenclatura IUPAC e CA);
- nome comune, ISO o proposto dall'ISO;
- numeri CAS, CEE (EINECS o ELINCS) e CIPAC, se disponibili;
- formula empirica e di struttura;
- massa molecolare.

3.5.3 Sulla formazione dei metaboliti attivi e dei prodotti di degradazione è necessario fornire informazioni che comprendono:

- i procedimenti, i meccanismi e le reazioni che intervengono;
- i dati cinetici e di altro tipo riguardanti il tasso di conversione e, se conosciuto, il sistema per limitare detto tasso;
- fattori ambientali e di altro tipo che influenzano il tasso e il grado di conversione.

### 3.6 **Informazioni sull'eventuale sviluppo di resistenza e appropriate strategie di prevenzione.**

E' necessario fornire informazioni sull'eventuale sviluppo di resistenza o resistenza incrociata, se disponibili.

### 3.7 **Metodi e precauzioni raccomandati per la manipolazione, l'immagazzinamento, il trasporto o in caso di incendio.**

Per tutte le sostanze attive è necessario fornire una "Scheda con avvertenze di sicurezza" della legge 29 maggio 1974, n. 256 e successivi aggiornamenti.

### 3.8. **Metodi di distruzione o di decontaminazione.**

#### 3.8.1 Incenerimento controllato.

In parecchi casi il sistema preferibile, oppure l'unico possibile per uno smaltimento sicuro di sostanze attive, materiali o imballaggi contaminati, consiste nell'incenerimento controllato effettuato in un inceneritore autorizzato.

Se il tenore di alogeni contenuti nella sostanza attiva è superiore al 60%, è necessario indicare il comportamento pirolitico della sostanza attiva in condizioni controllate (ivi inclusi, se del caso, la produzione di ossigeno ed il tempo di permanenza) a 800°C, nonché il tenore di dibenzo-p-diossine e dibenzofurani polialogenati nei prodotti di pirolisi. Il richiedente deve fornire istruzioni dettagliate ai fini di una eliminazione non pericolosa delle sostanze in questione.

#### 3.8.2 Altri.

E' necessario descrivere accuratamente altri metodi per lo smaltimento di sostanze attive, imballaggi e materiali contaminati, e fornire dati atti a determinare l'efficacia e la sicurezza di siffatti metodi.

### 3.9 **Misure di emergenza in caso di incidente.**

Devono essere specificati i metodi di decontaminazione dell'acqua in caso di incidente.

## 4. METODI ANALITICI

### Introduzione

Il presente capitolo verte esclusivamente sui metodi analitici richiesti per il controllo post-registrazione e la sorveglianza.

Per i metodi analitici impiegati ai fini dell'elaborazione di dati in conformità della presente direttiva, o per altri scopi, il richiedente deve giustificare il metodo utilizzato; se necessario, verranno messe a punto apposite istruzioni per questo tipo di metodi, sulla base degli stessi requisiti prescritti per i metodi impiegati a fini di controllo post-registrazione e di sorveglianza.

Devono essere fornite descrizioni di metodi comprendenti informazioni particolareggiate sulle attrezzature e i materiali utilizzati e le condizioni necessarie.

Ove possibile, questi metodi devono essere semplici, economici e basati sull'impiego di apparecchiature comunemente disponibili.

Ai fini del presente allegato si applicano le seguenti definizioni:

– *Impurezze*

qualsiasi componente diverso dalla sostanza attiva pura presente nella sostanza attiva prodotta (compresi gli isomeri inattivi) risultante dal procedimento di fabbricazione o dalla degradazione durante la conservazione.

– *Impurezze rilevanti*

impurezze aventi rilevanza tossicologica e/o ecotossicologica o ambientale.

– *Impurezze significative:*

impurezze contenute nella sostanza attiva prodotta in ragione di  $\geq 1$  g/Kg.

– *Metaboliti:*

metaboliti, compresi i prodotti risultanti dalla degradazione o dalla reazione della sostanza attiva.

– *Metaboliti rilevanti:*

metaboliti aventi rilevanza tossicologica e/o ecotossicologica o ambientale.

Devono essere forniti, su richiesta i seguenti campioni:

- i.) norme di analisi della sostanza attiva pura;
- ii.) campioni della sostanza attiva prodotta;
- iii.) norme di analisi dei metaboliti rilevanti e/o di altri componenti compresi nella definizione di residuo;
- iv.) se disponibili, campioni delle sostanze di riferimento delle impurezze rilevanti.

### 4.1 **Metodi per l'analisi della sostanza attiva prodotta**

Si applicano in merito le seguenti definizioni:

i) *Specificità*

La specificità è la capacità di un metodo di distinguere dalle altre la sostanza oggetto dell'analisi.

ii) *Linearità*

Per linearità si intende la capacità del metodo, in una data gamma, di ottenere una correlazione lineare accettabile tra i risultati e la concentrazione della sostanza da analizzare nei campioni.

iii) *Accuratezza*

L'accuratezza di un metodo è il grado in cui il valore determinato della sostanza da analizzare in un campione corrisponde al valore di riferimento accettato (per esempio in riferimento a ISO 5725).

iv) *Precisione*

La precisione è la concordanza tra risultati di prove indipendenti ottenuti nelle condizioni prescritte.

*Ripetibilità*: precisione in condizioni di ripetibilità, cioè in condizioni in cui i risultati di prove indipendenti sono ottenuti con lo stesso metodo su materiale di prova identico, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore con la stessa attrezzatura in brevi intervalli di tempo.

La *riproducibilità* non è richiesta per la sostanza attiva prodotta (per la definizione di riproducibilità vedi ISO 5725).

- 4.1.1. Devono essere forniti e descritti per intero i **metodi per la determinazione della sostanza attiva pura nella sostanza attiva prodotta**, conformemente alla specifica presentata a corredo della domanda di inclusione nell'allegato 1 della direttiva 91/414/CEE.  
Deve essere segnalata l'applicabilità di metodi CIPAC esistenti.
- 4.1.2. Devono essere indicati anche i **metodi** per la determinazione, nella sostanza attiva prodotta, di **impurezze significative** e/o rilevanti e di additivi (per esempio agenti stabilizzanti).
- 4.1.3. Specificità, linearità, accuratezza e ripetibilità
- 4.1.3.1. Deve essere dimostrata e indicata la **specificità dei metodi** presentati. Dev'essere inoltre determinato il grado d'interferenza di altre sostanze presenti nella sostanza attiva prodotta (per esempio isomeri, impurezze o additivi).  
Mentre le interferenze dovute ad altre componenti possono essere identificate come errori sistematici nella valutazione dell'accuratezza dei metodi proposti per la determinazione della sostanza attiva pura nella sostanza attiva prodotta, si deve fornire una spiegazione per ogni eventuale interferenza riscontrata che contribuisca per più del 3 % alla quantità totale determinata.  
Il grado di interferenza deve essere calcolato anche per i metodi di determinazione delle impurezze.
- 4.1.3.2. Deve essere determinata e indicata la linearità dei metodi proposti su una gamma adeguata. Per la determinazione della sostanza attiva pura, la gamma della calibrazione deve estendere (di almeno il 20 %) il tenore nominale più elevato e più basso della sostanza da analizzare nelle soluzioni analitiche pertinenti. Le doppie calibrazioni devono essere effettuate in 3 o più concentrazioni. Alternativamente, sono accettabili 5

concentrazioni, ciascuna come misura unica. Le relazioni presentate devono includere l'equazione della linea di calibrazione ed il coefficiente di correlazione, nonché la documentazione dell'analisi rappresentativa e correttamente etichettata, per esempio i cromatogrammi.

4.1.3.3. **L'accuratezza** è richiesta per i metodi di determinazione della sostanza attiva pura e delle impurezze significative e/o rilevanti nella sostanza attiva prodotta.

4.1.3.4. Per la **ripetibilità** nella determinazione della sostanza attiva pura, in linea di massima occorre un minimo di 5 determinazioni. Deve essere indicata la deviazione standard relativa (% RSD). I valori fuori scala identificati per mezzo di un metodo appropriato (per esempio Dixon o Grubbs) possono essere eliminati. L'eliminazione dei valori fuori scala deve essere chiaramente indicata. Si tenterà di spiegare perché si sono verificati singoli valori fuori scala.

## 4.2. **Metodi per la determinazione dei residui**

I metodi devono essere atti a determinare la sostanza attiva e/o i metaboliti rilevanti.

Per ogni metodo e per ogni matrice rappresentativa, si devono determinare in via sperimentale e indicare la specificità, la precisione, il recupero ed il limite di determinazione.

In linea di massima, i metodi proposti per la determinazione dei residui dovrebbero essere metodi multiresiduo. Un metodo multiresiduo standard deve essere valutato e indicato come idoneo alla determinazione dei residui. Se i metodi proposti non sono metodi multiresiduo, o non sono compatibili con tali metodi, dovrà essere proposto un metodo alternativo. Qualora ne consegua un eccesso di metodi per i singoli composti, potrà essere accettato un "metodo medio comune".

Ai fini del presente allegato si applicano le seguenti definizioni:

### i) *Specificità*

La specificità è la capacità di un metodo di distinguere la sostanza oggetto dell'analisi misurata da altre sostanze.

### ii) *Precisione*

La precisione è la concordanza tra risultati di prove indipendenti ottenuti nelle condizioni prescritte.

*Ripetibilità*: precisione in condizioni di ripetibilità, cioè in condizioni in cui i risultati di prove indipendenti sono ottenuti con lo stesso metodo su materiale di prova identico, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore con la stessa attrezzatura in brevi intervalli di tempo.

*Riproducibilità*: poiché la riproducibilità, quale definita nelle pubblicazioni pertinenti (per esempio in ISO 5725) non è applicabile ai metodi per la determinazione dei residui, la riproducibilità nel contesto della presente direttiva implica una convalida della ripetibilità del recupero, da matrici rappresentative e a livelli rappresentativi, da parte di almeno un laboratorio indipendente da quello che aveva convalidato inizialmente lo studio (questo laboratorio indipendente può tuttavia appartenere alla stessa società) (convalida indipendente in laboratorio).

iii) *Recupero*

Per recupero si intende la percentuale di sostanza attiva o di metabolita rilevante originariamente aggiunta ad un campione della matrice appropriata, che non contenga un livello misurabile della sostanza da analizzare.

iv) *Limite di determinazione*

Il limite di determinazione (spesso designato come limite di quantificazione) è la minima concentrazione di sostanza da analizzare alla quale si ha un recupero medio accettabile (normalmente il 70-110 % con una deviazione standard relativa preferibilmente del  $\leq 20$  %). In certi casi giustificati possono essere accettati tassi di recupero medi inferiori o superiori nonché una deviazione standard relativa più elevata).

4.2.1. Residui nei o sui vegetali, prodotti vegetali, prodotti alimentari (di origine vegetale e animale), alimenti per animali

I metodi presentati devono essere idonei alla determinazione di tutti i componenti che rientrano nella definizione di residuo presentata conformemente al punto 6, paragrafi 6.1 e 6.2, affinché gli Stati membri possano accertare il rispetto dei LRM stabiliti o determinare i residui eliminabili.

La specificità dei metodi deve permettere di determinare tutti i componenti che rientrano nella definizione di residuo, se necessario con un metodo di conferma supplementare.

La ripetibilità deve essere determinata e indicata. Le porzioni analitiche identiche per la prova possono essere preparate in base ad un campione comune trattato sul terreno, contenente i residui riscontrati. In via alternativa le porzioni analitiche identiche possono essere preparate in base ad un campione comune non trattato, con aliquote arricchite nella misura richiesta.

Devono essere indicati i risultati di una convalida ad opera di un laboratorio indipendente.

Il limite di determinazione, compreso il recupero individuale e medio, deve essere determinato e indicato. La deviazione standard relativa globale, come pure la deviazione standard relativa per ogni livello di arricchimento devono essere determinate in via sperimentale e riferite.

4.2.2. Residui nel suolo

Devono essere presentati i metodi di analisi del suolo per il composto originario e/o i metaboliti rilevanti.

La specificità dei metodi deve permettere di determinare il composto originario e/o i metaboliti rilevanti, se necessario con un metodo di conferma supplementare.

La ripetibilità, il recupero ed il limite di determinazione, compresi il recupero individuale e quello medio, devono essere determinati e indicati. La deviazione standard relativa globale, come pure la deviazione standard relativa per ogni livello di arricchimento devono essere determinate in via sperimentale e riferite.

Il limite di determinazione proposto non deve superare una concentrazione allarmante in caso di esposizione di organismi non bersaglio o per eventuali effetti fitotossici. Di norma, il limite di determinazione non dovrebbe essere superiore a 0,05 mg/kg.

#### 4.2.3. Residui nell'acqua (compresa l'acqua potabile, le acque sotterranee e le acque superficiali)

Devono essere presentati i metodi di analisi dell'acqua per il composto originario e/o i metaboliti rilevanti.

La specificità dei metodi deve permettere di determinare il composto originario e/o i metaboliti rilevanti, se necessario con un metodo di conferma supplementare.

La ripetibilità, il recupero ed il limite di determinazione, compresi il recupero individuale e quello medio, devono essere determinati e indicati. La deviazione standard relativa globale, come pure la deviazione standard relativa per ogni livello di arricchimento devono essere determinate in via sperimentale e riferite.

Il limite di determinazione proposto per l'acqua potabile non deve superare 0,1 mcg/l.

Per le acque superficiali, esso non deve superare una concentrazione i cui effetti sugli organismi non bersaglio siano considerati inaccettabili in base alle disposizioni dell'allegato VI.

#### 4.2.4. Residui nell'aria

Devono essere indicati i metodi per la determinazione della sostanza attiva e/o dei metaboliti rilevanti, formati durante o poco dopo l'applicazione, nell'aria, a meno che non si possa dimostrare l'improbabilità dell'esposizione di operatori o altre persone presenti.

La specificità dei metodi deve permettere di determinare il composto originario e/o i metaboliti rilevanti, se necessario con un metodo di conferma supplementare.

La ripetibilità, il recupero ed il limite di determinazione, compresi il recupero individuale e quello medio, devono essere determinati e indicati. La deviazione standard relativa globale, come pure la deviazione standard relativa per ogni livello di arricchimento devono essere determinate in via sperimentale e riferite.

Il limite di determinazione proposto deve tenere conto dei valori limite basati su considerazioni sanitarie o del livello di esposizione pertinente.

#### 4.2.5. Residui nei liquidi fisiologici e nei tessuti

Quando una sostanza attiva è classificata come tossica o molto tossica, si devono presentare metodi di analisi adatti.

La specificità dei metodi deve permettere di determinare il 'composto originario e/o i metaboliti rilevanti, se necessario con un metodo di conferma supplementare.

La ripetibilità, il recupero ed il limite di determinazione, compresi il recupero individuale e quello medio, devono essere determinati e indicati. La deviazione standard relativa globale, come pure la deviazione standard relativa per ogni livello di arricchimento devono essere determinate in via sperimentale e riferite.

## 5. STUDI TOSSICOLOGICI E SUL METABOLISMO

### Introduzione

- i) Le informazioni fornite, insieme con quelle precisate per uno o più preparati contenenti la sostanza attiva, devono essere tali da consentire una valutazione dei rischi per l'uomo associati alla manipolazione e all'utilizzazione di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva, nonché il rischio per l'uomo derivante da tracce residue negli alimenti e nell'acqua. Inoltre queste informazioni devono essere sufficienti per:
- poter decidere se la sostanza attiva possa essere inclusa o meno nell'Allegato 1;
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni da associare all'eventuale inclusione nell'Allegato 1;
  - classificare la sostanza attiva in rapporto alla sua pericolosità;
  - stabilirne il livello di assunzione giornaliera ammissibile per l'uomo (ADI);
  - stabilirne i livelli di esposizione ammissibili per gli operatori (AOEL);
  - specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'uomo, degli animali e dell'ambiente da apporre sull'imballaggio (contenitori);
  - precisare le misure di pronto soccorso e le opportune misure diagnostiche e terapeutiche in caso di avvelenamento nell'uomo;
  - poter valutare la natura e il grado dei rischi per l'uomo, per gli animali (specie normalmente alimentate e allevate o le cui carni sono consumate dall'uomo) nonché dei rischi per altre specie di vertebrati non bersaglio.
- ii) Occorre ricercare e indicare tutti i possibili effetti nocivi riscontrati negli studi tossicologici di routine (ivi inclusi gli effetti su organi e su sistemi speciali quali l'immunotossicità e la neurotossicità); occorre effettuare ed indicare tali studi supplementari che possono essere necessari per individuare il probabile meccanismo coinvolto, stabilire i NOAELS (livelli a cui non sono stati osservati effetti dannosi) e valutare l'importanza di questi effetti. Devono essere indicati tutti i dati e le informazioni di ordine biologico disponibili e utili per valutare il profilo tossicologico della sostanza.
- iii) Per quanto riguarda la possibile incidenza delle impurezze sul comportamento tossicologico è essenziale che in ogni studio presentato venga fatta una descrizione particolareggiata (specifiche) del materiale utilizzato, come indicato al punto 1.11. Le prove devono essere effettuate utilizzando la sostanza attiva conforme alle specifiche da applicare nella fabbricazione dei preparati da autorizzare, eccetto il caso in cui sia necessaria o consentita l'utilizzazione di materiale radiomarcato.
- iv) Se gli studi vengono svolti utilizzando una sostanza attiva prodotta in laboratorio o in un sistema di produzione di un impianto pilota, gli studi devono essere ripetuti utilizzando la sostanza attiva tecnica, a meno che si possa dimostrare che il materiale di prova utilizzato sia sostanzialmente lo stesso ai fini della prova e della valutazione tossicologica. In caso di incertezza, devono essere presentati opportuni studi di connessione in base ai quali si possa decidere circa la necessità o meno di ripetere gli studi.

- v) Qualora si tratti di studi in cui il dosaggio deve essere somministrato in un certo periodo, si dovrebbe utilizzare preferibilmente un'unica partita di sostanza attiva, semprechè la stabilità lo consenta.
- vi) In tutti gli studi deve essere indicata la dose reale massima somministrata, espressa in mg/kg di peso corporeo e in altre unità adeguate. Se le dosi vengono somministrate con la dieta, la sostanza in esame deve essere uniformemente distribuita nella dieta stessa.
- vii) Se, a seguito del metabolismo o di altri processi in o su piante trattate oppure a seguito della trasformazione di prodotti trattati, il residuo finale (a cui saranno esposti i consumatori o i lavoratori, come definito all'allegato III, punto 7.2.3) contiene sostanze diverse dalla sostanza attiva stessa e non identificate come metaboliti presenti nei mammiferi, occorrerà effettuare studi di tossicità su questi componenti del residuo finale, a meno che si possa dimostrare che l'esposizione dei consumatori o dei lavoratori a queste sostanze non costituisce un rischio considerevole per la salute. Occorre effettuare studi di tossicocinetica e sul metabolismo dei metaboliti e dei prodotti di degradazione solo se non è possibile valutare le conclusioni sulla tossicità del metabolita sulla base dei risultati disponibili sulla sostanza attiva.
- viii) La scelta della via di somministrazione della sostanza in esame dipende dalle principali vie di esposizione. Nel caso in cui l'esposizione avviene essenzialmente in fase gassosa, può essere più adeguato effettuare studi di assorbimento per via inalatoria anziché per via orale.

#### 5.1 **Studi sull'assorbimento, sulla distribuzione, sull'escrezione e sul metabolismo nei mammiferi**

A questo riguardo sono necessari soltanto dati abbastanza limitati, come descritto in seguito, su di una sola specie animale (normalmente il ratto). Questi dati possono fornire utili informazioni per l'organizzazione e l'interpretazione di test successivi di tossicità. Tuttavia occorre tener presente che i dati sulle differenze interspecie possono essere essenziali nelle estrapolazioni all'uomo e che le informazioni sulla penetrazione cutanea, sull'assorbimento, sulla distribuzione, sull'escrezione e sul metabolismo possono essere utili ai fini delle valutazioni del rischio per gli operatori. Non è possibile specificare requisiti particolareggiati per ciascun settore poiché i requisiti specifici dipenderanno dai risultati ottenuti per ciascuna particolare sostanza in esame.

##### Scopo del test.

I test devono fornire dati sufficienti per poter:

- valutare la velocità e il grado di assorbimento;
- la distribuzione tissutale, nonché la velocità e il livello dell'escrezione della sostanza e dei suoi metaboliti;
- identificare i metaboliti e la via metabolica.

Occorrerebbe, inoltre, studiare l'effetto della dose sui suddetti parametri ed analizzare se i risultati differiscono in caso di somministrazione unica o ripetuta della dose.

### Circostanze di necessità dei test.

Occorre svolgere, riportandone i risultati, uno studio tossicocinetico di somministrazione in dose unica nel ratto (per via orale) ad almeno due livelli di dosaggio, nonché uno studio tossicocinetico di somministrazione in dosi ripetute nel ratto (per via orale) ad un solo livello di dosaggio. Può essere necessario, in taluni casi, effettuare studi supplementari su un'altra specie (ad esempio, capra o pollo).

Disciplinare per le prove.

Direttiva 87/302/CEE della Commissione del 18 novembre 1987 (Allegato, parte B, tossicocinetica).

## 5.2 **Tossicità acuta**

Gli studi e i dati da fornire devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti di una esposizione unica alla sostanza attiva e, in particolare, stabilire o indicare:

- la tossicità della sostanza attiva;
- il decorso e le caratteristiche degli effetti, con dettagli completi sui mutamenti comportamentali ed eventuali reperti macropatologici post mortem;
- ove possibile, le modalità dell'attività tossica;
- il relativo rischio associato a vie differenti di esposizione.

Sebbene l'interesse principale debba riguardare la possibilità di valutare i livelli di tossicità, i dati ottenuti devono anche consentire di classificare la sostanza attiva in conformità alle prescrizioni di cui alla legge 29.5.1974, n. 256, e successive modifiche, di attuazione della direttiva 67/548/CEE del Consiglio. I dati ottenuti dai test di tossicità acuta sono di particolare utilità per valutare i possibili rischi conseguenti ad incidenti.

### 5.2.1 Orale

#### Circostanze di necessità dei test.

Deve sempre essere indicata la tossicità acuta per via orale della sostanza attiva.

#### Disciplinare per le prove.

Il test deve essere effettuato conformemente all'allegato della direttiva 92/69/CEE della Commissione del 31 luglio 1992, recante il diciassettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose, metodo B1 o B1 bis.

### 5.2.2 Cutanea.

#### Circostanze di necessità dei test.

Deve sempre essere indicata la tossicità cutanea acuta della sostanza attiva.

### Disciplinare per le prove.

Devono essere studiati gli effetti sia locali che sistemici. Il test deve essere effettuato conformemente alla direttiva 92/69/CEE, metodo B3.

#### 5.2.3 Inalatoria.

##### Circostanze di necessità del test.

Deve essere indicata la tossicità inalatoria della sostanza attiva quando quest'ultima:

- è un gas o un gas liquefatto;
- deve essere utilizzata come fumigante;
- deve essere incorporata in un preparato fumigante o aerosol o di vapore;
- deve essere utilizzata con apparecchiature di nebulizzazione;
- ha una pressione di vapore maggiore di  $1 \times 10^{-2}$  Pa e deve essere incorporata in preparati che vengono utilizzati in spazi chiusi, come serre o magazzini;
- deve essere incorporata in preparati costituiti da polveri contenenti una considerevole percentuale di particelle di diametro minore di 50  $\mu\text{m}$  (più dell'1% in peso);
- deve essere incorporata in preparati che, quando vengono utilizzati, producono una considerevole percentuale di particelle o goccioline di diametro minore di 50  $\mu\text{m}$  (più dell'1% in peso).

### Disciplinare per le prove.

Il test deve essere effettuato conformemente alla direttiva 92/69/CEE, metodo B2.

#### 5.2.4 Irritazione cutanea.

##### Scopo del test.

Il test deve condurre a stabilire l'irritabilità cutanea della sostanza attiva ed anche l'eventuale reversibilità degli effetti osservati.

##### Circostanze di necessità del test.

Deve essere determinata l'irritabilità cutanea della sostanza attiva, salvo nel caso in cui è probabile, come indicato nella disciplinare per le prove, che si possano produrre gravi effetti cutanei o che si possano escludere effetti.

### Disciplinare per le prove.

Il test di irritazione dermica acuta deve essere effettuato conformemente alla direttive 92/69/CEE, metodo B4.

### 5.2.5 Irritazione oculare.

#### Scopo del test.

Il test deve stabilire l'irritabilità oculare della sostanza attiva e l'eventuale reversibilità degli effetti osservati.

#### Circostanze di necessità del test.

Il test di irritabilità oculare deve essere effettuato salvo nel caso in cui risulta probabile, come indicato nella disciplina per le prove, che si possano produrre gravi effetti sugli occhi.

#### Disciplinare per le prove.

Il test di irritazione oculare acuta deve essere effettuato conformemente alla direttiva 92/69/CEE, metodo B5.

### 5.2.6 Sensibilizzazione cutanea

#### Scopo del test.

Il test deve fornire dati sufficienti per poter valutare la probabilità che la sostanza attiva provochi reazioni di sensibilizzazione cutanea.

#### Circostanze di necessità del test.

Il test deve essere effettuato sempre, salvo se la sostanza è un noto sensibilizzante.

#### Disciplinare per le prove.

Il test deve essere effettuato conformemente alla direttiva 92/69/CEE, metodo B6.

### 5.3 **Tossicità a breve termine.**

Devono essere approntati studi sulla tossicità a breve termine che forniscano dati sulla quantità tollerabile di sostanza attiva senza effetti tossici nelle condizioni dello studio. Questi studi forniscono dati utili sui rischi per i manipolatori e gli utilizzatori di preparati contenenti la sostanza attiva. In particolare, gli studi di tossicità a breve termine forniscono un quadro essenziale delle eventuali azioni cumulative della sostanza attiva e sui rischi per i lavoratori che vi possono essere esposti intensivamente. Da questi studi si ottengono inoltre utili informazioni per l'approntamento di studi sulla tossicità cronica.

Gli studi e i dati da fornire devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti dell'esposizione ripetuta e, in particolare, stabilire o indicare:

- il rapporto tra dose ed effetti nocivi;
- la tossicità della sostanza attiva, ivi incluso, se possibile, il NOAEL;

- gli organi bersaglio, se del caso;
- il decorso e le caratteristiche dell'avvelenamento con dettagli completi sui mutamenti comportamentali e le eventuali constatazioni patologiche post mortem;
- gli effetti tossici specifici e i mutamenti patologici prodotti;
- se del caso, la persistenza e la reversibilità di certi effetti tossici osservati, dopo sospensione del dosaggio;
- se del caso, le modalità dell'attività tossica;
- il relativo rischio associato alle vie differenti di esposizione.

#### 5.3.1 Studio di tossicità orale a 28 giorni.

##### Circostanze di necessità del test.

Gli studi a breve termine a 28 giorni, sebbene non obbligatori, possono essere utili come test circa l'estensione del campo d'interesse. Qualora vengano effettuati, i relativi risultati devono essere indicati poiché potrebbero essere di particolare utilità per l'individuazione di risposte adattative eventualmente mascherate negli studi di tossicità cronica.

##### Disciplinare per le prove.

Il test deve essere effettuato conformemente alla direttiva 92/69/CEE, metodo B7.

#### 5.3.2 Studio di tossicità orale a 90 giorni.

##### Circostanze di necessità del test.

Deve sempre essere riportata la tossicità orale a breve termine (90 giorni) della sostanza attiva sul ratto e sul cane. Qualora risulti che il cane è considerevolmente più sensibile e che probabilmente tali dati sono utili nell'estrapolazione dei risultati all'uomo, occorre effettuare uno studio di tossicità a 12 mesi sul cane e riportarne i risultati.

##### Disciplinare per le prove.

Direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B, saggio di tossicità orale sub cronica.

#### 5.3.3 Altre vie.

##### Circostanze di necessità dei test.

Per la valutazione dell'esposizione degli operatori, possono risultare utili altri studi di tossicità dermica.

Per le sostanze volatili (pressione di vapore maggiore di  $10^{-2}$  Pa) occorre il parere di esperti per decidere se gli studi a breve termine debbano essere effettuati con esposizione per via orale o inalatoria.

Guide per i test.

- dermica a 28 giorni: direttiva 92/69/CEE, metodo B9;

- dermica a 90 giorni: direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B, saggio di tossicità dermica subcronica;
- inalatoria a 28 giorni: direttiva 92/69/CEE, metodo B8;
- inalatoria a 90 giorni: direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B, saggio di tossicità subcronica inalatoria.

#### 5.4 **Genotossicità.**

##### Scopo del test.

Questi studi sono utili per:

- predire il potenziale genotossico;
- individuare precocemente gli agenti cancerogeni genotossici;
- chiarire il meccanismo d'azione di alcuni agenti cancerogeni.

Per evitare risposte artefatte del sistema in esame, non devono essere utilizzate dosi estremamente tossiche nelle prove di mutagenesi in vitro o in vivo. Questo approccio deve essere considerato come orientamento generale. E' importante che venga adottato un approccio flessibile e che si decida di effettuare ulteriori test in base all'interpretazione dei risultati di ogni fase.

##### 5.4.1 Studi in vitro.

##### Circostanze di necessità dei test.

I test di mutagenesi in vitro (prova batterica di mutazione genica, test di clastogenesi in cellule di mammiferi e test di mutazione genica in cellule di mammiferi) devono essere effettuati sempre.

##### Disciplinare per le prove.

Esempi di test accettabili:

- direttiva 92/69/CEE, metodo B14 - Saggio di reversione nella Salmonella Typhimurium;
- direttiva 92/69/CEE, metodo B10 - Saggio citogenetico "in vitro" nei mammiferi;
- direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B - Cellule di mammiferi in vitro: saggio di mutazione genica.

##### 5.4.2 Studi in vivo su cellule somatiche

##### Circostanze di necessità dei test.

Se tutti i risultati dei test in vitro sono negativi, dev'essere effettuata un'ulteriore sperimentazione, prendendo in considerazione altri dati pertinenti disponibili (ivi compresi dati tossicocinetici, tossicodinamici e chimico-fisici, nonché dati su sostanze analoghe); la prova può consistere in uno studio in vivo o in vitro, effettuato utilizzando un sistema con metabolismo differente da quello/quelli utilizzati precedentemente.

Se l'esito del test di citogenesi in vitro è positivo, deve essere effettuato un test in vivo utilizzando cellule somatiche (analisi della metafase nel midollo osseo di roditori o test del micronucleo in roditori).

Se l'esito di almeno uno dei test di mutazione genica in vitro è positivo, occorre effettuare un test in vivo della sintesi non programmata del DNA o un test delle macchie (spot test) sul topo.

#### Disciplinare per le prove.

Test accettabili:

- direttiva 92/69/CEE, metodo B12 - Saggio di micronucleo;
- direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B - Saggio delle macchie (spot test);
- direttiva 92/69/CEE, metodo B11 - Saggio citogenetico "in vivo" del midollo osseo nei mammiferi; analisi cromosomica.

#### 5.4.3 Studi "in vivo" su gonoblasti.

##### Circostanze di necessità dei test.

Se l'esito di uno studio in vivo su cellule somatiche è positivo, può essere giustificato eseguire test in vivo per determinare gli effetti sui gonoblasti. La necessità o meno di questi test sarà valutata caso per caso, tenendo conto dei dati tossicocinetici, dell'utilizzazione e dell'esposizione prevista. Sarebbero necessari test opportuni per esaminare l'interazione con il DNA (ad esempio, il saggio dei letali dominanti) e le potenzialità di effetti ereditari con un'eventuale valutazione quantitativa. Data la loro complessità, si ammette che gli studi quantitativi siano necessari solo se fortemente motivati.

#### 5.5 Tossicità a lungo termine e cancerogenesi

##### Scopo dei test.

Gli studi a lungo termine, considerati congiuntamente ad altri dati sulla sostanza attiva, devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti di un'esposizione ripetuta alla sostanza attiva e, in particolare, per:

- individuare gli effetti dannosi dell'esposizione alla sostanza attiva;
- individuare gli organi bersaglio, se del caso;
- stabilire il rapporto dose/risposta;
- individuare i mutamenti dei segni e delle manifestazioni di tossicità osservati;
- stabilire il NOAEL.

Analogamente gli studi di cancerogenesi, congiuntamente con altri dati sulla sostanza attiva, devono essere sufficienti per valutare i rischi per l'uomo conseguenti ad esposizione ripetuta alla sostanza attiva e, in particolare, per:

- individuare gli effetti cancerogeni dell'esposizione alla sostanza attiva;
- determinare la specificità dei tumori indotti riguardo specie ed organi;

- stabilire il rapporto dose/risposta;
- per quanto riguarda gli agenti cancerogeni non genotossici, determinare la dose massima che non provoca effetti dannosi (dose soglia).

#### Circostanze di necessità dei test.

Devono essere determinate la tossicità a lungo termine e la cancerogenesi di tutte le sostanze attive. Se si ritiene che, in casi eccezionali, non sia necessario procedere ai test, occorre darne chiara giustificazione e cioè dai dati tossicocinetici deve risultare che la sostanza attiva non viene assorbita attraverso l'intestino, la pelle o il sistema respiratorio.

#### Condizioni sperimentali.

Deve essere effettuato uno studio di tossicità per via orale e di cancerogenesi a lungo termine (due anni) della sostanza attiva sul ratto; questi studi possono essere associati.

Deve essere effettuato uno studio di cancerogenesi della sostanza attiva sul topo.

Qualora si supponga la probabilità di un meccanismo genotossico di cancerogenesi, occorre presentare uno studio molto circostanziato, con relativi dati sperimentali, nonché le informazioni necessarie per chiarire il probabile meccanismo ipotizzato.

Sebbene gli elementi di riferimento standard per le risposte al trattamento siano dati di controllo concomitanti, possono rivelarsi utili dati di controllo storici per l'interpretazione di particolari studi di cancerogenesi. I dati di controllo storici eventualmente presentati devono riguardare la stessa specie e lo stesso ceppo, conservato in condizioni simili, e devono essere ottenuti da studi contemporanei. Le informazioni sui dati di controllo storici devono comprendere:

- l'identificazione della specie e del ceppo, il nome del fornitore e l'identificazione della colonia specifica, qualora l'ubicazione geografica del fornitore non sia unica;
- il nome del laboratorio e la data di esecuzione dello studio;
- la descrizione delle condizioni generali di mantenimento degli animali, ivi inclusi il tipo e la qualità della dieta e, ove possibile, la quantità consumata;
- l'età approssimativa (in giorni) degli animali di controllo all'inizio dello studio e al momento della soppressione o della morte;
- la descrizione dell'andamento osservato della mortalità del gruppo di controllo nel corso o al termine dello studio nonché altre osservazioni utili (ad esempio malattie, infezioni);
- il nome del laboratorio e dei responsabili della raccolta e dell'interpretazione dei dati patologici ottenuti dallo studio;
- la specificazione della natura dei tumori che, in associazione, possono aver avuto rilevanza sull'incidenza.

Le dosì da somministrare, ivi inclusa quella più elevata, devono essere scelte in base ai risultati di test a breve termine e, se possibile, al momento della programmazione degli studi in questione, sulla base di dati metabolici e tossicocinetici. Nello studio di cancerogenesi, il livello di dosaggio più elevato deve provocare segni di tossicità minima, come il leggero calo dell'aumento del peso corporeo (meno del 10%), senza

causare necrosi tissutale o saturazione metabolica e senza alterare sostanzialmente la normale durata di vita per cause non tumorali. Se viene effettuato separatamente uno studio di tossicità a lungo termine, il livello di dosaggio più elevato deve provocare determinati segni di tossicità senza causare una mortalità eccessiva. Dosi più elevate provocanti tossicità eccessiva non sono considerate di rilievo ai fini delle valutazioni da effettuare.

Nella raccolta dei dati e nella compilazione delle relazioni di studio, non devono essere combinate le incidenze di tumori benigni e di tumori maligni, a meno che non vi sia chiara prova che tumori benigni si trasformino, col passare del tempo, in tumori maligni.

Analogamente nelle relazioni di studio non devono essere combinati tumori dissimili e non associati (sia benigni che maligni) che si producono nello stesso organo. Per evitare confusioni, nella nomenclatura e nelle relazioni sui tumori dev'essere utilizzata la terminologia approntata dall'"American Society of Toxicologic Pathologists" o dall'"Hannover Tumor Registry (RENI)". Occorre specificare il sistema terminologico utilizzato.

E' essenziale che tra i materiali biologici selezionati per l'esame istopatologico siano compresi materiali atti a fornire ulteriori informazioni sulle lesioni rilevate nell'esame macropatologico. Qualora utili per chiarire il meccanismo d'azione e qualora siano disponibili le relative tecniche, occorre svolgere, riportandone i risultati, studi istologici speciali (colorazione), studi istochimici ed esami al microscopio elettronico.

#### Disciplinare per le prove.

Gli studi devono essere effettuati conformemente alla direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B, saggio di tossicità cronica, saggio di cancerogenesi o saggio combinato di tossicità cronica/cancerogenesi.

### 5.6 **Tossicità sulla riproduzione.**

Gli effetti dannosi sulla riproduzione sono principalmente di due tipi:

- danno della fertilità del maschio o della femmina;
- incidenze sullo sviluppo normale della progenie (tossicità sullo sviluppo).

Devono essere studiati ed indicati gli eventuali effetti su tutti gli aspetti della fisiologia della riproduzione sia nei maschi che nelle femmine, nonché gli eventuali effetti sullo sviluppo pre e post-natale. Qualora, in casi eccezionali, si ritenga che il test non sia necessario, occorre darne chiara e completa motivazione.

Sebbene gli elementi di riferimento standard per le risposte al trattamento siano dati di controllo concomitanti, possono rivelarsi utili dati di controlli storici per l'interpretazione di particolari studi sulla riproduzione. I dati di controllo storici eventualmente presentati devono riguardare la stessa specie e lo stesso ceppo, conservato in condizioni simili, e devono essere ottenuti da studi contemporanei. Le informazioni sui dati di controllo storici devono comprendere:

- l'identificazione della specie e del ceppo, il nome del fornitore e l'identificazione della colonia specifica, qualora l'ubicazione geografica del fornitore non sia unica;

- il nome del laboratorio e la data di esecuzione dello studio;
- la descrizione delle condizioni generali di mantenimento degli animali, ivi inclusi il tipo e la qualità della dieta e, ove possibile, la quantità consumata;
- l'età approssimativa (in giorni) degli animali di controllo all'inizio dello studio e al momento della soppressione o della morte;
- la descrizione dell'andamento osservato della mortalità del gruppo di controllo nel corso o al termine dello studio, nonché altre osservazioni utili (ad esempio, malattie, infezioni);
- il nome del laboratorio e dei responsabili della raccolta e dell'interpretazione dei dati tossicologici ottenuti dallo studio.

#### 5.6.1 Studi multigenerazionali.

##### Scopo dei test.

Gli studi, congiuntamente con altri dati sulla sostanza attiva, devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti sulla riproduzione conseguenti ad esposizione ripetuta alla sostanza attiva e, in particolare, per:

- individuare gli effetti diretti ed indiretti sulla riproduzione conseguenti all'esposizione alla sostanza attiva;
- individuare l'eventuale aumento di effetti tossici generali (osservati nei test di tossicità a breve termine e cronica);
- stabilire il rapporto dose/risposta;
- individuare le variazioni delle manifestazioni e dei segni tossici osservati;
- stabilire il NOAEL.

##### Circostanze di necessità dei test.

Occorre sempre presentare una relazione di studio della tossicità sulla riproduzione nel ratto su almeno due generazioni.

##### Disciplinare per le prove.

I test devono essere effettuati conformemente alla direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B, saggio di tossicità sulla riproduzione: due generazioni. Occorre inoltre indicare il peso degli organi riproduttivi.

##### Studi supplementari.

Per una migliore interpretazione degli effetti sulla riproduzione potrebbe essere necessario effettuare gli studi supplementari seguenti (semprechè non siano già disponibili i relativi dati):

- studi separati su maschio e su femmina;
- modelli trisegmentali;
- saggio dei letali dominanti per la fertilità del maschio;
- accoppiamenti incrociati di maschi trattati con femmine non trattate e viceversa;
- effetto sulla spermatogenesi;
- effetti sulla ovogenesi;

- motilità, mobilità e morfologia dello sperma;
- esame dell'attività ormonale.

#### 5.6.2 Studi di tossicità sullo sviluppo.

##### Scopo dei test.

Le relazioni sugli studi effettuati, congiuntamente con altri dati sulla sostanza attiva, devono essere sufficienti per poter valutare gli effetti sullo sviluppo embrionale e fetale conseguenti ad esposizione ripetuta alla sostanza attiva e, in particolare, per:

- individuare gli effetti diretti ed indiretti sullo sviluppo embrionale e fetale derivanti da esposizione alla sostanza attiva;
- evidenziare l'eventuale tossicità materna;
- stabilire il rapporto tra risposte osservate e dose nella genitrice e nella figliata;
- individuare le variazioni delle manifestazioni e dei segni tossici osservati;
- stabilire il NOAEL.

Inoltre, i test forniranno altre informazioni su eventuali aumenti degli effetti tossici generali nelle femmine gravide.

##### Circostanze di necessità dei test.

I test di teratogenesi devono essere effettuati sempre.

##### Condizioni sperimentali.

Deve essere stabilita la tossicità sullo sviluppo, sia nel ratto che nel coniglio, per via orale. Dovrebbero essere descritte separatamente le malformazioni e le alterazioni. Nella relazione deve essere indicato un glossario terminologico ed i principi diagnostici riguardo a tutte le malformazioni e le alterazioni.

##### Disciplinare per le prove.

I test devono essere effettuati conformemente alla direttiva 87/302/CEE, allegato, parte B, saggio di teratogenesi: roditori e non roditori.

#### 5.7. Studi di neurotossicità tardiva.

##### Scopo dei test.

I test devono fornire dati sufficienti per valutare se la sostanza attiva può provocare neurotossicità tardiva dopo esposizione acuta.

##### Circostanze di necessità dei test.

Questi studi devono essere effettuati per sostanze con struttura simile o connessa con quella di sostanze che possono indurre neurotossicità tardiva, come gli organofosfati.

## Disciplinare per le prove.

I test devono essere effettuati conformemente agli orientamenti OCSE 418.

### 5.8. **Altri studi tossicologici**

#### 5.8.1 Studi di tossicità dei metaboliti: punto vii) dell'introduzione.

Non è necessario eseguire normalmente studi supplementari riguardanti sostanze diverse dalla sostanza attiva.

Una decisione sulla necessità o meno di eseguire questi studi deve essere presa caso per caso.

#### 5.8.2 Studi supplementari sulla sostanza attiva.

In taluni casi può essere necessario effettuare studi supplementari per chiarire maggiormente gli effetti osservati. Ad esempio:

- studi sull'assorbimento, la distribuzione, l'escrezione ed il metabolismo;
- studi sul potenziale neurotossico;
- studi sul potenziale immunotossicologico;
- studi su altre vie di somministrazione.

La decisione circa le necessità o meno di svolgere studi supplementari deve essere presa caso per caso, tenendo conto dei risultati degli studi disponibili tossicologici e sul metabolismo, nonché delle più importanti vie di esposizione.

Questi studi devono essere progettati singolarmente, sulla base dei parametri particolari di interesse e degli obiettivi da conseguire.

### 5.9. **Dati clinici**

Se disponibili e fatte salve le disposizioni dell'articolo 5 della direttiva 80/1107/CEE del Consiglio, del 27 novembre 1980, relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro, devono essere forniti informazioni e dati sperimentali utili per il riconoscimento dei sintomi di avvelenamento e riguardanti l'efficacia delle misure terapeutiche e di primo intervento. Dovrebbero essere forniti riferimenti più specifici per lo studio degli antidoti e dei farmaci di sicurezza. Se del caso, dovrebbe essere studiata, riportandone i risultati, l'efficacia dei possibili antagonisti dell'avvelenamento.

Se disponibili e se sufficientemente attendibili, sono di particolare utilità dati ed informazioni relativi agli effetti dell'esposizione dell'uomo, per confermare la validità delle estrapolazioni e delle conclusioni concernenti gli organi bersaglio, i rapporti dose/risposta e la reversibilità degli effetti tossici. Questi dati possono essere ottenuti a seguito di esposizione professionale o da incidente.

#### 5.9.1 Controllo medico sul personale degli impianti di fabbricazione.

Devono essere presentate relazioni sui programmi di controllo sanitario sui lavoratori del settore, con informazioni particolareggiate sulla strutturazione del programma, sull'esposizione alla sostanza attiva ed ad altri prodotti chimici. Tali relazioni dovrebbero contenere, ove possibile, dati sul meccanismo d'azione della sostanza attiva e devono riportare dati, se disponibili, relativi a persone esposte negli impianti di fabbricazione o dopo applicazione della sostanza attiva (ad esempio in prove di efficacia).

Devono essere fornite le informazioni disponibili sulla sensibilizzazione e sulla risposta allergenica di lavoratori e di altre persone esposte alla sostanza attiva; se del caso, queste informazioni devono contenere dettagli sull'eventuale incidenza di casi di ipersensibilità nonché sulla frequenza, sul livello e sulla durata dell'esposizione, i sintomi osservati ed altre informazioni cliniche pertinenti.

#### 5.9.2 Osservazione diretta (ad esempio casi clinici e di avvelenamento).

Devono essere presentate le relazioni disponibili, tratte dalla letteratura, su casi clinici e di avvelenamento tratti da pubblicazioni scientifiche o da rapporti ufficiali, unitamente alle relazioni su eventuali studi d'analisi successivi. Esse dovrebbero contenere descrizioni complete della natura, del livello e della durata dell'esposizione, dei sintomi clinici osservati, delle misure terapeutiche e di primo intervento applicate nonché le misurazioni e le osservazioni fatte. Non sono di particolare utilità informazioni sintetiche e riassunti.

Questa documentazione, se sufficientemente dettagliata, può essere di particolare utilità per confermare o meno la validità delle estrapolazioni dall'animale all'uomo e per individuare effetti dannosi non previsti specifici dell'uomo.

#### 5.9.3 Osservazioni sull'esposizione della popolazione in generale e studi epidemiologici, se del caso.

Sono di particolare utilità e devono essere presentati studi epidemiologici, se disponibili, se corredati da dati su livelli e sulla durata dell'esposizione e se effettuati secondo norme e metodi riconosciuti.

#### 5.9.4 Diagnosi dell'avvelenamento (determinazione della sostanza attiva e dei metaboliti), segni specifici di avvelenamento, test clinici.

Deve essere fornita una descrizione particolareggiata dei segni e dei sintomi clinici dell'avvelenamento (ivi inclusi quelli precoci) con dettagli completi dei test clinici utili ai fini diagnostici, se disponibili. Occorre inoltre fornire informazioni particolareggiate sui relativi decorsi e concernenti l'ingestione, l'esposizione dermica o l'inalazione di quantità variabili della sostanza attiva.

5.9.5      Trattamento proposto: misure di pronto soccorso, antidoti, trattamento medico.

Devono essere indicate le misure di pronto soccorso in caso di avvelenamento (reale o sospetto) ed in caso di contaminazione degli occhi.

Devono essere descritti dettagliatamente i regimi terapeutici in caso di avvelenamento o di contaminazione degli occhi e gli eventuali antidoti disponibili. Devono essere fornite informazioni - basate sull'esperienza pratica, se disponibili, o su fondamenti teorici, in caso contrario - sull'efficacia di trattamenti alternativi. Devono essere descritte le controindicazioni associate a particolari regimi, soprattutto in relazione a "problemi medici generali" - e le relative condizioni.

5.9.6      Effetti previsti dell'avvelenamento.

Occorre descrivere, se noti, gli effetti previsti dell'avvelenamento e la loro durata; inoltre:

- il tipo, il livello e la durata dell'esposizione o dell'ingestione;
- i vari periodi di tempo tra esposizione o ingestione e inizio del trattamento.

5.10      **Sintesi della tossicità nei mammiferi e valutazione complessiva.**

Deve essere presentata una sintesi di tutti i dati di cui dal punto 5.1. al punto 5.10, con una loro valutazione particolareggiata e critica, tenendo presente i pertinenti criteri e orientamenti valutativi e decisionali, con particolare riferimento ai rischi, reali o eventuali, per l'uomo e per gli animali, unitamente ad indicazioni sull'estensione, la qualità e l'affidabilità della base di dati.

Deve essere discussa la pertinenza e l'importanza dei dati presentati, se del caso, per quanto riguarda la valutazione del profilo tossicologico della sostanza attiva tecnica, alla luce delle conclusioni relative al profilo analitico dei lotti della sostanza attiva (punto 1.11) e degli eventuali studi di connessione effettuati (punto 5, iv).

Devono essere specificate le motivazioni di scelta dei NOAEL proposti in ciascuno studio, sulla base di una valutazione dei dati e dei pertinenti criteri ed orientamenti decisionali.

In base a tali dati, devono essere presentate proposte, scientificamente motivate, di fissazione di valori ADI e AOEL per la sostanza attiva.

## 6. RESIDUI IN O SU PRODOTTI TRATTATI, ALIMENTI PER L'UOMO E GLI ANIMALI.

### Introduzione

- (i) Le informazioni fornite, insieme con quelle precisate per uno o più preparati contenenti la sostanza attiva, devono essere tali da consentire una valutazione dei rischi per l'uomo derivanti dai residui della sostanza attiva e dai relativi metaboliti, prodotti di degradazione e di reazione rimanenti negli alimenti. Inoltre, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:
  - poter decidere se la sostanza attiva possa essere inclusa o meno nell'allegato I;
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni da associare all'eventuale inclusione nell'allegato I.
- (ii) Deve essere fornita una descrizione particolareggiata (specifiche) del materiale utilizzato, come indicato al punto 1.11.
- (iii) Gli studi devono essere effettuati secondo quanto indicato nella guida disponibile sui metodi di prova regolamentari per i residui di prodotti fitosanitari negli alimenti.<sup>(\*)</sup>
- (iv) Se del caso, i dati devono essere analizzati mediante appropriati metodi statistici. Dovranno essere riportati dettagli completi dell'analisi statistica.
- (v) Stabilità dei residui durante l'immagazzinamento.

Può risultare necessario svolgere studi di stabilità dei residui durante l'immagazzinamento. A condizione che i campioni vengano congelati, di norma, entro 24 ore dal campionamento e salvo si sappia per altra via che un composto è volatile o labile, tali dati non sono richiesti per campioni prelevati ed analizzati entro 30 giorni dal campionamento (6 mesi, in caso di materiale radiomarcato).

Occorre effettuare studi con sostanze non radiomarcate utilizzando substrati rappresentativi e preferibilmente su campioni di colture trattate o di animali su cui si sono riscontrati residui. In alternativa, se ciò non è possibile, aliquote di campioni di controllo preparati devono venire addizionate di una quantità nota di composto chimico prima dell'immagazzinamento in condizioni di immagazzinamento normali.

Qualora la degradazione dei campioni durante il loro immagazzinamento fosse significativa (superiore al 30%), può essere necessario modificare le condizioni di immagazzinamento oppure non conservati prima dell'analisi e ripetere gli studi se le condizioni di immagazzinamento sono state insoddisfacenti.

Occorre presentare informazioni dettagliate sulla preparazione del campione e sulle condizioni di immagazzinamento (temperatura e durata) dei campioni e degli estratti. Salvo che i campioni vengano analizzati entro 24 ore dall'estrazione, saranno necessari anche dati sulla stabilità all'immagazzinamento ottenuti su estratti del campione.

---

\* Guida in fase di elaborazione

## 6.1 **Metabolismo, distribuzione ed espressione del residuo nelle piante**

### Scopo dei test

Questi studi vengono eseguiti con l'obiettivo di:

- fornire una stima dei residui finali totali nella porzione di interesse delle piante coltivate al momento della raccolta dopo il trattamento proposto;
- identificare i componenti principali del residuo finale totale;
- indicare la distribuzione dei residui tra le parti di interesse della pianta coltivata;
- quantificare i componenti principali del residuo e determinare l'efficienza delle procedure di estrazione per questi componenti;
- stabilire la definizione e l'espressione del residuo.

### Circostanze di necessità dei test

Questi studi devono sempre venire eseguiti salvo che si possa comprovare che non rimangono residui sulle piante o sui prodotti vegetali utilizzati come alimenti per l'uomo o per gli animali.

### Condizioni sperimentali

Gli studi sul metabolismo devono comprendere piante o categorie di piante coltivate sulle quali verrebbero utilizzati i prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva in questione. Se è prevista un'ampia gamma di utilizzi in differenti categorie di coltivazioni o nella categoria "frutta", gli studi vanno eseguiti su almeno tre coltivazioni a meno che si possa motivare l'improbabilità di un metabolismo differente. Se è previsto l'impiego su varie categorie di coltivazioni gli studi devono essere rappresentativi delle pertinenti categorie. A questo scopo le coltivazioni possono essere suddivise in cinque categorie: radici commestibili, ortaggi a foglie, frutta, leguminose e semi oleosi, cereali. Se sono disponibili studi per coltivazioni appartenenti a tre di queste categorie ed i risultati indicano che la via di degradazione è simile nelle tre categorie, non dovrebbe essere necessario effettuare studi ulteriori, a meno che si possa prevedere un metabolismo differente. Gli studi di metabolismo devono tener conto anche delle differenti proprietà della sostanza attiva e del metodo di applicazione previsto.

Deve essere fornita una valutazione dei risultati dei vari studi, circa il sito e la via di assorbimento (per esempio attraverso le foglie o le radici), nonché circa la distribuzione dei residui nelle varie parti del vegetale al momento del raccolto (con particolare riguardo per la parti commestibili per l'uomo o per gli animali). Se la sostanza attiva, o i metaboliti importanti vengono assorbiti dalla pianta coltivata, si dovrà fornire una spiegazione. Nella valutazione dei dati sperimentali, possono essere utili informazioni sulla modalità di azione e sulle proprietà chimico-fisiche della sostanza attiva.

## 6.2 **Metabolismo, distribuzione ed espressione del residuo nel bestiame**

### Scopo dei test

Questi studi vengono eseguiti con l'obiettivo di:

- identificare i componenti principali del residuo finale totale presente in prodotti animali commestibili;
- quantificare la velocità di degradazione e di escrezione del residuo totale in certi prodotti (latte e uova) ed escrezioni animali;
- indicare la distribuzione dei residui tra i pertinenti prodotti animali commestibili;
- quantificare componenti principali del residuo e dimostrare l'efficienza delle procedure di estrazione per questi componenti;
- generare dati che permettano di decidere se occorrono gli studi di alimentazione del bestiame di cui al punto 6.4;
- stabilire la definizione e l'espressione del residuo.

### Circostanze di necessità dei test

Studi di metabolismo su animali, come ruminanti da latte (per esempio capra o vacca) o galline ovaiole, sono richiesti solo quando l'utilizzo del prodotto fitosanitario può portare a residui significativi negli alimenti per il bestiame ( $\geq 0,1$  mg/kg della dieta totale assunta, salvo casi speciali come sostanze attive che tendono ad accumularsi). Se risulta evidente che i percorsi metabolici differiscono in modo significativo nel ratto in confronto ai ruminanti, deve essere condotto uno studio sul maiale, salvo che si preveda che la quantità assunta dai maiali non sia significativa.

## 6.3 **Sperimentazioni sui residui**

### Scopo dei test

Questi studi vengono eseguiti con l'obiettivo di:

- quantificare i livelli probabili più elevati di residui nelle colture trattate, al momento della raccolta o del prelievo dai magazzini, secondo la buona pratica agricola (BPA) proposta; e
- determinare, se del caso, la velocità di riduzione dei depositi di prodotti fitosanitari.

### Circostanze di necessità dei test

Questi studi devono sempre venire eseguiti nel caso in cui il prodotto fitosanitario venga applicato a piante o prodotti vegetali utilizzati come alimenti per l'uomo o per gli animali oppure nel caso in cui tali piante possono assorbire residui dal terreno o da altri substrati, salvo che sia possibile un'estrapolazione da dati adeguati ottenuti su un'altra coltura.

Nel fascicolo di cui all'allegato II si dovranno fornire dati relativi alle sperimentazioni sui residui, per gli usi di prodotti fitosanitari per i quali viene richiesta l'autorizzazione al momento della presentazione di un dossier per l'inclusione della sostanza attiva nell'allegato I.

### Condizioni sperimentali

Le prove controllate devono corrispondere alla BPA critica proposta. Le condizioni sperimentali devono tener conto dei residui massimi che possono ragionevolmente verificarsi (p. es. numero massimo di applicazioni proposte, uso della massima quantità prevista, minimi intervalli di sicurezza prima della raccolta, periodi di sospensione dell'applicazione o periodi di immagazzinamento) ma che rimangono rappresentative delle peggiori condizioni possibili in cui la sostanza attiva potrebbe venire utilizzata.

Occorre produrre e presentare dati sufficienti a conferma che i modelli stabiliti sono validi nelle regioni e nelle condizioni in esse probabili, per le quali è raccomandato l'uso del prodotto.

Nella definizione di un programma di sperimentazioni controllate, si deve normalmente tener conto di fattori come differenze climatiche esistenti tra le aree di produzione, differenze nei metodi di produzione (p. es. usi in campo aperto rispetto all'uso in serra), stagioni di produzione, tipo di formulazione ecc.

In generale, per una serie di condizioni paragonabili, le sperimentazioni devono venire eseguite in almeno due stagioni di coltivazione. Qualsiasi eccezione deve essere motivata in modo esauriente.

E' difficile determinare con precisione il numero di prove necessarie senza una valutazione preliminare dei risultati sperimentali. I dati minimi richiesti valgono solo quando si possa stabilire che le aree di produzione sono paragonabili, per esempio per quanto riguarda il clima, i metodi e le stagioni di coltivazione del prodotto, ecc. Supposto che tutte le altre variabili (clima ecc.) siano confrontabili, per le coltivazioni principali sono richieste almeno otto prove rappresentative dell'area di coltivazione proposta. Per le coltivazioni minori, sono normalmente richieste quattro prove rappresentative dell'area di coltivazione proposta.

A motivo del livello di omogeneità intrinsecamente più elevato dei residui risultanti da trattamenti post-raccolta o presenti su coltivazioni protette, saranno accettabili prove eseguite in una sola stagione di coltivazione. Per i trattamenti post-raccolta, in linea di principio sono richieste almeno quattro prove eseguite preferibilmente in diverse località con differenti coltivazioni. Occorre eseguire una serie di prove per ciascun metodo di applicazione e ciascun tipo di immagazzinamento, salvo che si possa identificare con chiarezza la situazione peggiore per quanto riguarda i residui.

Si può ridurre il numero degli studi per periodo vegetativo che occorre svolgere se si può comprovare che i livelli di residui nelle piante e nei prodotti vegetali saranno inferiori al limite di determinazione.

Nel caso che al momento dell'applicazione del prodotto sia presente una parte significativa della coltura consumabile, devono essere presentati dati sulla metà delle

sperimentazioni controllate sui residui che mostrino la variazione nel tempo del livello di residui presente (studi di decadimento dei residui), a meno che si possa comprovare che l'applicazione del prodotto fitosanitario non ha alcun effetto sulla coltura consumabile, nelle condizioni d'impiego proposte.

#### 6.4. **Studi di alimentazione del bestiame**

##### Scopo dei test

Questi studi hanno l'obiettivo di determinare il residuo in prodotti di origine animale derivante da residui contenuti negli alimenti per animali o nelle piante foraggere.

##### Circostanze di necessità dei test

Studi di alimentazione sono richiesti solo:

- quando nelle piante coltivate o nella parti di pianta (p. es. scarti, scorie) utilizzate per l'alimentazione degli animali si hanno residui significativi ( $\geq 0,1$  mg/kg della dieta totale ricevuta, salvo casi speciali, come sostanze attive che si accumulano)
- e
- studi metabolici indicano che in qualsiasi tessuto commestibile dell'animale si possono avere residui significativi (0,01 mg/kg, o superiori al limite di determinazione nel caso questo fosse superiore a 0,01 mg/kg), tenendo conto dei livelli dei residui in mangimi potenziali, ottenuti per una dose di base.

Se del caso, occorre presentare studi di alimentazione separati per ruminanti da latte e/o pollame da cova. Se dagli studi sul metabolismo presentati conformemente al punto 6.2 risulta che i percorsi metabolici differiscono in modo significativo nel maiale in confronto ai ruminanti, si deve condurre uno studio sull'alimentazione del maiale, salvo che si preveda che la quantità assunta da quest'ultimo non sia significativa.

##### Condizioni sperimentali

In generale, il mangime viene somministrato a tre dosaggi (livello di residui previsto, 3-5 volte e 10 volte il livello di residui previsto). Nel definire la dose di base, si deve compilare una razione di alimentazione teorica.

#### 6.5. **Effetti della trasformazione industriale e/o delle preparazioni domestiche**

##### Circostanze di necessità dei test

La decisione se sia necessario eseguire studi sulla trasformazione industriale dipenderà:

- dall'importanza di un prodotto trasformato nella dieta umana o animale;
- dal livello del residuo nella pianta o nel prodotto vegetale da trasformare;
- dalle proprietà chimico-fisiche della sostanza attiva o dei relativi metaboliti;
- dalla possibilità che si possano ritrovare prodotti di degradazione di rilevanza tossicologica dopo la trasformazione del vegetale o del prodotto vegetale.

Normalmente non sarà necessario effettuare studi sulla trasformazione industriale se nel vegetale o nel prodotto vegetale che verrebbe trasformato non sono presenti residui significativi o determinabili per via analitica, oppure se l'assunzione giornaliera massima teorica totale (TMDI) è inferiore al 10% dell'ADI. Inoltre, questi studi non saranno normalmente neppure necessari per piante o prodotti vegetali che nella maggior parte dei casi vengono consumati crudi, salvo quelli con parti non eduli come limoni, banane, o kiwi, riguardo i quali possono essere necessari dati sulla distribuzione del residuo nella buccia/polpa.

Per "residui significativi" si intendono in generale residui superiori a 0,1 mg/kg. Se il prodotto fitosanitario interessato presenta una tossicità acuta elevata e/o una ADI bassa, si dovrà prendere in considerazione l'eventualità di eseguire studi di trattamento per residui determinabili inferiori a 0,1 mg/kg.

Questi studi non sono normalmente necessari se il processo di trasformazione comporta soltanto semplici operazioni fisiche (come lavaggio, pulitura o pressatura) che non comportano una variazione della temperatura della pianta o del prodotto vegetale.

#### 6.5.1 Effetti sulla natura del residuo

##### Scopo dei test

L'obiettivo di questi studi è di stabilire se da residui contenuti nei prodotti non trasformati possano eventualmente formarsi, durante il trattamento, prodotti di decomposizione o di reazione che possono rendere necessaria una valutazione specifica dei rischi.

##### Condizioni sperimentali

Secondo il livello e la natura chimica del residuo contenuto nel prodotto non trasformato, si dovrà esaminare, se del caso, una serie di situazioni rappresentative di idrolisi (che simulino le pertinenti operazioni di trasformazione). Può essere inoltre necessario studiare gli effetti di trasformazioni diverse dall'idrolisi se dalle proprietà della sostanza attiva o dei suoi metaboliti si può dedurre che a seguito di tali trasformazioni si possono ritrovare prodotti di degradazione di rilevanza tossicologica. Gli studi vengono normalmente condotti con una forma radiomarcata della sostanza attiva.

#### 6.5.2 Effetti sui livelli dei residui

##### Scopo dei test

Gli obiettivi principali di questi studi sono:

- determinare la distribuzione quantitativa dei residui nei vari prodotti intermedi e finali, e stimare fattori di trasferimento;
- permettere una stima più realistica dell'assunzione di residui attraverso la dieta.

### Condizioni sperimentali

Gli studi di processo dovrebbero rappresentare trattamenti domestici e/o processi industriali effettivi.

Nel primo caso, sarà normalmente necessario eseguire solo una serie centrale di “studi di bilancio” rappresentativi dei trattamenti comuni eseguiti sulle piante o sui prodotti vegetali contenenti residui significativi. La scelta di questi processi rappresentativi dovrà essere validamente motivata. La tecnologia da usarsi negli studi di trasformazione deve sempre corrispondere il più strettamente possibile alle effettive condizioni normalmente utilizzate nella pratica. Si dovrà produrre una scheda analitica del bilancio di massa dei residui in tutti i prodotti intermedi e finali. In tale scheda si devono poter individuare le concentrazioni o le riduzioni di residui nei singoli prodotti e determinare i corrispondenti fattori di trasferimento.

Se i prodotti vegetali trasformati hanno una parte importante nella dieta e se gli “studi di bilancio” indicano che può verificarsi un trasferimento significativo di residui nei prodotti trasformati, si devono eseguire tre studi di controllo (“follow-up”) per determinare la concentrazione dei residui o i fattori di diluizione.

## 6.6 **Residui in colture successive**

### Scopo del test

Questi studi hanno l’obiettivo di permettere una valutazione di possibili residui in colture successive.

### Circostanze di necessità del test

Se dai dati ottenuti conformemente all’allegato II, punto 7.1 o all’allegato III, punto 9.1, risulta che nel suolo o in materiali vegetali (come paglia o materiale organico) permangono quantità significative di residui (superiori al 10% della sostanza attiva applicata, considerando globalmente la sostanza attiva non modificata ed i suoi pertinenti metaboliti o prodotti di degradazione) sino all’epoca della semina o dell’impianto di eventuali colture successive, quantità che potrebbero comportare livelli di residui superiori al limite di determinazione nelle colture successive al momento del raccolto, dovrà essere esaminata la situazione circa i residui. Questo esame dovrà tener conto anche della natura del residuo nelle colture successive e dovrà contenere almeno una stima teorica del livello di questi residui. Se non si può escludere la probabilità della presenza di residui nelle colture successive, occorre effettuare studi di metabolismo e di distribuzione e, se necessario, seguiti da prove in campo.

### Condizioni sperimentali

Qualora venga effettuata una stima teorica dei residui nelle colture successive, occorre fornire i dettagli completi con relativa motivazione.

Se sono necessari studi sul metabolismo e sulla distribuzione nonché prove in campo, questi devono essere eseguiti su colture rappresentative della normale pratica agricola.

**6.7. Livelli massimi di residui proposti (MRL) e definizione di residuo**

I livelli massimi di residui proposti devono essere accompagnati da una motivazione completa includente, se del caso, dettagli completi dell'analisi statistica utilizzata.

Nella valutazione di quali composti debbano essere inclusi nella definizione di residuo, si deve tener conto dell'importanza tossicologica dei composti, delle quantità probabili presenti e della praticità dei metodi analitici proposti per il controllo e la vigilanza successivi alla registrazione.

**6.8. Intervalli di sicurezza pre-raccolta proposti per gli usi previsti, o periodi di sospensione dell'applicazione o periodi di immagazzinamento nel caso di utilizzi post-raccolta**

Le proposte devono essere accompagnate da una motivazione completa.

**6.9. Stima dell'esposizione potenziale ed effettiva attraverso la dieta ed altre vie**

Si dovrà porre attenzione al calcolo di una previsione realistica dell'assunzione attraverso la dieta. Ciò può venire realizzato per gradi, arrivando a previsioni sempre più realistiche della quantità assunta. Se del caso, si devono prendere in considerazione anche altre fonti di esposizione, per esempio residui da medicinali o da farmaci per uso veterinario.

**6.10 Sintesi e valutazione del comportamento dei residui**

Si dovrà eseguire una sintesi ed una valutazione di tutti i dati presentati in questa sezione secondo le direttive impartite dalle autorità competenti degli Stati membri per quanto riguarda il formato di tali sintesi e valutazioni. Vi dovranno figurare una valutazione dettagliata e critica dei dati nel contesto di criteri e disciplinari di valutazione e di decisione pertinenti, con particolare riferimento ai rischi che nascono o possono nascere per l'uomo o gli animali ed alla completezza, qualità ed affidabilità dei dati disponibili.

In particolare deve essere presa in considerazione la significatività tossicologica dei metaboliti in animali diversi dai mammiferi.

Si dovrà elaborare un diagramma schematico del percorso metabolico in piante ed animali con una breve spiegazione della distribuzione e delle trasformazioni chimiche implicate.

7. **DESTINO E COMPORTAMENTO AMBIENTALE (AGGIORNATO DALLA DIRETTIVA 95/36/CE)**

**Introduzione**

- (i) Le informazioni fornite, insieme con quelle relative ad uno o più preparati contenenti la sostanza attiva, devono essere idonee a consentire una valutazione del destino e del comportamento della sostanza attiva nell'ambiente, nonché dei possibili rischi per le specie non bersaglio derivanti dall'esposizione alla sostanza attiva, ai suoi metaboliti, ai prodotti di reazione e di degradazione, qualora siano di rilevanza tossicologica o ambientale.
- (ii) In particolare, tutte queste informazioni dovrebbero essere sufficienti per:
- poter decidere se la sostanza attiva possa essere iscritta o meno nell'allegato I;
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni da associare all'eventuale iscrizione nell'allegato I;
  - classificare la sostanza attiva in ordine alla sua pericolosità;
  - specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'ambiente, da apporre sull'imballaggio (contenitori);
  - poter prevedere la distribuzione, il destino e il comportamento nell'ambiente della sostanza attiva e dei relativi metaboliti e prodotti di degradazione e di reazione, nonché i relativi tempi;
  - identificare le popolazioni e le specie non bersaglio per le quali la possibile esposizione della sostanza attiva può presentare pericoli;
  - specificare le misure necessarie per ridurre al minimo la contaminazione dell'ambiente e l'impatto sulla specie non bersaglio.
- (iii) Deve essere fornito il profilo analitico del materiale utilizzato, come indicato al punto 1.11. Nelle prove in cui viene impiegata la sostanza attiva, il materiale utilizzato deve essere conforme alle specifiche cui si dovrà attenere nella fabbricazione dei preparati da autorizzare, salvo in caso di utilizzazione di materiale radiomarcato. Se nelle prove viene utilizzata una sostanza attiva prodotta in laboratorio o in un impianto pilota, le prove devono essere ripetute utilizzando la sostanza attiva prodotta industrialmente, a meno che si possa dimostrare che il materiale di prova utilizzato sia essenzialmente lo stesso ai fini del controllo e della valutazione ambientale.
- (iv) Se viene utilizzato materiale di prova radiomarcato, i radiomarcanti devono essere posti in siti (uno o più, se necessario) tali da agevolare la comprensione delle vie metaboliche e di degradazione, nonché lo studio della distribuzione della sostanza attiva e dei suoi metaboliti, dei prodotti di reazione e di degradazione nell'ambiente.
- (v) Può risultare necessario svolgere studi distinti sui metaboliti e sui prodotti di degradazione o di reazione, qualora:
- questi possano costituire un rischio considerevole per organismi non bersaglio o per la qualità delle acque, del terreno e dell'aria,
  - i loro effetti non possano essere valutati in base ai risultati disponibili sulla sostanza attiva.
- Prima di svolgere questi studi occorrerà prendere in considerazione i dati degli studi di cui ai punti 5 e 6.
- (vi) Se del caso, occorrerà programmare le prove ed analizzare i dati, applicando adeguati metodi statistici. Dovranno essere riportati i dettagli completi dell'analisi statistica (ad

esempio, devono essere indicati tutti i valori con i relativi intervalli di confidenza e dovrebbero essere specificati gli esatti valori di p piuttosto che la semplice indicazione di significativo o non significativo).

## 7.1. Destino e comportamento nel suolo.

Devono essere riportate tutte le informazioni pertinenti sul tipo e sulle proprietà del suolo utilizzato negli studi, ivi inclusi il PH, il contenuto di carbonio organico, la capacità di scambio cationico, la distribuzione delle particelle in base alla loro dimensione e la capacità di ritenzione d'acqua a  $pF=0$  e  $pF=2,5$  in conformità con le relative norme ISO o altre norme internazionali.

Deve essere determinata, appena prima dell'inizio e alla fine dello studio, la biomassa microbica dei terreni utilizzati per gli studi di degradazione in laboratorio.

Si raccomanda di utilizzare il più possibile gli stessi suoli in tutti gli studi di laboratorio sul suolo.

I suoli utilizzati negli studi sulla degradazione o sulla mobilità devono essere selezionati in modo da essere rappresentativi dell'intera gamma di terreni tipici delle differenti regioni comunitarie in cui vengono utilizzati o di cui è prevista l'utilizzazione; in particolare:

- i suoli devono coprire un certo intervallo di contenuto di carbonio organico, la distribuzione delle particelle secondo le loro dimensioni e i valori di PH e
- qualora, in base ad altri dati, si supponga che la degradazione o la mobilità dipenda dal PH (ad esempio, solubilità e velocità di idrolisi punto 2.7 e 2.8) devono essere considerati i seguenti intervalli di PH:
  - da 4,5 a 5,5,
  - da 6 a 7, e
  - 8 (approssimativamente).

I suoli da utilizzare devono essere, se possibile, campionati di recente. Qualora sia inevitabile l'utilizzazione di suoli conservati, la conservazione deve essere stata effettuata correttamente per un periodo di tempo limitato e in determinate condizioni specifiche. I suoli conservati per tempi più lunghi possono essere utilizzati solo per gli studi di adsorbimento e di desorbimento.

Il suolo scelto per iniziare lo studio non deve avere caratteristiche estreme per quanto riguarda parametri quali la distribuzione delle particelle in base alla loro dimensione, il contenuto di carbonio organico e il PH.

I suoli dovrebbero essere raccolti e manipolati conformemente alla norma ISO 10381-6 (Soil quality - Sampling - Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of microbial processes in the laboratory). Le eventuali variazioni dalla norma devono essere indicate e motivate.

Gli studi sul campo devono essere effettuati in condizioni quanto più prossime possibili a quelle della normale pratica agricola su una gamma rappresentativa di tipi di suolo e di condizioni climatiche delle zone di utilizzazione. Per gli studi sul campo, devono essere riportate le relative condizioni meteorologiche.

### 7.1.1. Velocità e via di degradazione nel suolo.

#### 7.1.1.1. Via di degradazione nel suolo.

### Scopo dei test.

I dati forniti, assieme con altre informazioni pertinenti, dovrebbero essere sufficienti per:

- identificare, se possibile, l'importanza relativa dei tipi di processo che intervengono (bilancio tra degradazione chimica e biologica);
- identificare i singoli componenti che in qualsiasi momento sono in una percentuale superiore al 10% della quantità di sostanza attiva aggiunta, ivi inclusi, se fattibile, i residui non estraibili;
- identificare, se possibile, anche i singoli componenti presenti in percentuale inferiore al 10% della quantità di sostanza attiva aggiunta;
- stabilire i rapporti relativi dei componenti presenti (bilancio delle masse);
- poter definire i residui di interesse nel suolo e a quali di questi residui sono o possono essere esposte specie non bersaglio.

Qualora sia fatto riferimento a residui non estraibili, questi vengono definiti come specie chimiche provenienti da prodotti fitosanitari, utilizzati secondo la buona pratica agricola, che non possono essere estratti con metodi tali da non modificare significativamente la natura chimica di detti residui. I frammenti delle vie metaboliche che conducono ai prodotti naturali non sono considerati residui non estraibili.

#### 7.1.1.1.1. Degradazione aerobica.

##### Necessità del test.

Occorre sempre riportare la via o le vie di degradazione, salvo il caso in cui la natura e il modo di utilizzazione dei preparati contenenti la sostanza attiva escludono la contaminazione del suolo (quali, ad esempio, le utilizzazioni su prodotti immagazzinati o i trattamenti di ferite di alberi).

##### Condizioni sperimentali.

Devono essere riportate la/e via/e di degradazione relativa ad un suolo. I risultati devono essere presentati sotto forma di grafici schematici nei quali siano indicate le vie di degradazione coinvolte e sia illustrato il bilancio della distribuzione del radiomarcante, in funzione del tempo,

- nella sostanza attiva;
- nel CO<sub>2</sub>;
- nei composti volatili differenti dal CO<sub>2</sub>;
- nei singoli prodotti di trasformazione identificati;
- nelle sostanze estraibili non identificate;
- nei residui non estraibili nel suolo.

La ricerca delle vie di degradazione deve comprendere tutte le fasi possibili atte a caratterizzare e a quantificare i residui non estraibili formati dopo 100 giorni, se superiori al 70% della dose applicata della sostanza attiva. Le tecniche e le metodologie migliori da applicare verranno scelte caso per caso. Qualora i composti in questione non siano caratterizzati occorre darne motivazione.

Di norma, deve trattarsi di uno studio della durata di 120 giorni, salvo il caso in cui, dopo un periodo più breve, i livelli di residui non estraibili e di CO<sub>2</sub> siano tali che sia possibile la loro estrapolazione a 100 giorni.

Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

7.1.1.1.2. Studi supplementari.

- Degradazione anaerobica.

Necessità del test.

Devono essere riportati i risultati di uno studio di degradazione anaerobica, a meno che si possa asserire, con le debite motivazioni, che è improbabile l'utilizzazione dei prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva in condizione anaerobica.

Condizioni sperimentali e linea guida per il test.

Si applica quanto indicato al corrispondente paragrafo del punto 7.1.1.1.1.

- Fotolisi del suolo.

Necessità del test.

Devono essere riportati i risultati di uno studio sulla fotolisi del suolo, a meno che si possa asserire, con le debite motivazioni, che è improbabile il deposito della sostanza attiva sulla superficie del suolo.

Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

7.1.1.2. Velocità di degradazione.

7.1.1.2.1. Studi di laboratorio.

Scopo dei test.

Gli studi di degradazione nel suolo dovrebbero fornire le migliori stime possibili del tempo necessario per la degradazione del 50% e del 90% ( $DT_{50lab}$  e  $DT_{90lab}$ ) della sostanza attiva e dei relativi metaboliti, dei prodotti di reazione e di degradazione in condizioni di laboratorio.

- Degradazione aerobica

Necessità del test.

Occorre sempre riportare la via o le vie di degradazione, salvo nel caso in cui la natura e il modo di utilizzazione dei prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva escludono la contaminazione del suolo quali, ad esempio, le utilizzazioni su prodotti immagazzinati o i trattamenti di ferite di alberi.

Condizioni sperimentali:

Occorre indicare la velocità di degradazione aerobica della sostanza attiva in tre tipi di suolo oltre a quello indicato al punto 7.1.1.1.1.

Per studiare l'influenza della temperatura di degradazione, occorre effettuare uno studio supplementare a 10° C su uno dei suoli utilizzati per lo studio della degradazione a 20° C, finché non sarà disponibile un modello di calcolo comunitario per l'estrapolazione delle velocità di degradazione a basse temperature.

Di norma, lo studio deve avere la durata di 120 giorni, salvo se in un periodo più breve si sia degradato oltre il 90% della sostanza attiva.

Devono essere riportati i risultati di studi analoghi riguardanti tre tipi di suolo per tutti i relativi metaboliti, i prodotti di reazione e di degradazione presenti nel suolo e che in qualsiasi momento nel corso degli studi rappresentano più del 10% della quantità di sostanza attiva aggiunta, salvo qualora sia possibile determinare i loro valori DT<sub>50lab</sub> in base ai risultati degli studi di degradazione con la sostanza attiva.

Linea guida per il test:

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

- Degradazione anaerobica.

#### Necessità del test.

Deve essere indicata la velocità di degradazione anaerobica della sostanza attiva, qualora sia necessario effettuare uno studio anaerobico secondo quanto indicato al punto 7.1.1.1.2.

#### Condizioni sperimentali.

Deve essere riportata la velocità di degradazione anaerobica della sostanza attiva nel suolo utilizzato per lo studio anaerobico eseguito secondo quanto indicato al punto 7.1.1.1.2.

Di norma, la durata dello studio è di 120 giorni, salvo se in un periodo più breve si sia degradato oltre il 90% della sostanza attiva.

Devono essere riportati i risultati di studi analoghi riguardanti tutti i metaboliti, i prodotti di reazione e di degradazione presenti nel suolo e che in qualsiasi momento nel corso degli studi rappresentano più del 10% della quantità di sostanza attiva aggiunta, salvo qualora sia possibile determinare i loro valori DT<sub>50lab</sub> in base ai risultati degli studi di degradazione con la sostanza attiva.

#### Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

### 7.1.1.2.2. Studi in campo.

- Studi in campo.

#### Scopo dei test.

Questi studi dovrebbero fornire stime del tempo necessario per la dissipazione del 50% e del 90% (DT<sub>50f</sub> e DT<sub>90f</sub>) della sostanza attiva in condizioni simili a quelle di utilizzazione in campo. Se del caso, devono essere riportate informazioni sui relativi metaboliti e sui prodotti di reazione e di degradazione.

#### Necessità dei test.

I test devono essere effettuati nel caso in cui il valore di  $DT_{50lab}$ , a 20° C e ad un'umidità del suolo correlato ad un valore pF compreso tra 2 e 2,5 (pressione di aspirazione), è maggiore di 60 giorni.

Se i prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva sono destinati ad essere utilizzati in condizioni climatiche rigide, i test devono essere effettuati se il valore di  $DT_{50lab}$  a 10° C e ad un'umidità del suolo correlato ad un valore di pF compreso tra 2 e 2,5 (pressione di aspirazione) è maggiore di 90 giorni.

#### Condizioni sperimentali.

I singoli studi devono essere proseguiti su una serie di suoli rappresentativi (normalmente su quattro differenti tipi di suolo) finché non si sia dissipato più del 90% della quantità applicata. La durata massima degli studi è di 24 mesi.

#### Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

- Studi sui residui nel suolo.

#### Scopo dei test.

Questi studi devono fornire stime dei livelli dei residui nel suolo all'epoca del raccolto o della semina o dell'impianto delle colture successive.

#### Necessità dei test.

Occorre riportare i dati di questi studi qualora il valore  $DT_{50lab}$  sia maggiore di un terzo del tempo che intercorre tra l'applicazione e il raccolto e qualora sia possibile l'assorbimento nella coltura successiva, salvo il caso in cui i residui nel suolo all'epoca della semina o dell'impianto di una coltura successiva possano essere valutati in modo affidabile in base ai dati degli studi di dissipazione nel suolo o se si possa asserire, con le debite motivazioni, che tali residui non possono essere fitotossici per le colture a rotazione o permangono in queste a livelli inaccettabili.

#### Condizioni sperimentali.

I singoli studi devono essere proseguiti sino al raccolto o all'epoca della semina o dell'impianto delle colture successive a meno che non si sia dissipato oltre il 90% della quantità applicata.

#### Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

- Studi sull'accumulo nel suolo.

#### Scopo dei test.

I test dovrebbero fornire dati sufficienti per poter valutare la possibilità di accumulo dei residui della sostanza attiva e dei metaboliti, dei prodotti di degradazione e di reazione.

#### Necessità dei test.

Se dagli studi di dissipazione nel suolo risulta che il valore  $DT_{90f}$  è maggiore di 1 anno e se sono previste applicazioni ripetute nello stesso periodo vegetativo o negli anni successivi, occorre effettuare studi sulla possibilità di accumulo di residui nel suolo e sul livello di concentrazione massima (di plateau) raggiungibile a meno che non vengano presentati dati affidabili ottenuti con un opportuno modello di calcolo o altro appropriato metodo di valutazione.

#### Condizioni sperimentali.

Devono essere effettuati studi a lungo termine in campo e comportanti diverse applicazioni su due tipi di suolo pertinenti.

Il richiedente deve ottenere preventivamente l'accordo delle autorità competenti sul tipo di studio da effettuare.

### 7.1.2. Adsorbimento e desorbimento.

#### Scopo dei test.

I dati forniti insieme con altre pertinenti informazioni dovrebbero essere sufficienti per determinare il coefficiente di adsorbimento della sostanza attiva, dei metaboliti e dei prodotti di degradazione e di reazione.

#### Necessità dei test.

Questi studi devono essere riportati sempre, a meno che la natura e il modo di utilizzazione dei preparati contenenti la sostanza attiva escludano la contaminazione del suolo come, ad esempio, le utilizzazioni su prodotti immagazzinati o i trattamenti di ferite degli alberi.

#### Condizioni sperimentali.

Gli studi sulla sostanza attiva devono essere effettuati e riportati per quattro tipi di terreno.

Studi analoghi, per almeno tre tipi di suolo, devono essere riportati per tutti i relativi metaboliti, i prodotti di degradazione e di reazione che negli studi di degradazione sono stati rilevati, in qualsiasi momento, a valori superiori al 10% della quantità della sostanza attiva aggiunta.

#### Linea guida per il test.

Metodo OCSE 106.

### 7.1.3. Mobilità nel suolo.

#### 7.1.3.1. Studi di lisciviazione su colonna.

#### Scopo dei test.

I test devono fornire dati sufficienti per poter valutare la mobilità e la lisciviabilità della sostanza attiva e, se possibile, dei relativi metaboliti e dei prodotti di degradazione e di reazione.

#### Necessità dei test.

Devono essere effettuati studi su quattro suoli, qualora dagli studi di adsorbimento e di desorbimento di cui al punto 7.1.2 non sia possibile ottenere valori affidabili del coefficiente di adsorbimento.

Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

7.1.3.2. Lisciviazione su colonna di residui stagionati.

Scopo del test.

Il test deve fornire dati sufficienti per poter stimare la mobilità e la lisciviabilità dei metaboliti e dei prodotti di degradazione e di reazione.

Necessità dei test.

Gli studi devono essere effettuati salvo il caso in cui:

- la natura e il modo di utilizzazione dei preparati contenenti la sostanza attiva escludono la contaminazione del suolo come, ad esempio, le utilizzazioni sui prodotti immagazzinati o i trattamenti di ferite delle piante oppure
- è stato effettuato uno studio specifico relativo ai metaboliti e ai prodotti di degradazione o di reazione secondo quanto specificato al punto 7.1.2 o al punto 7.1.3.1.

Condizioni sperimentali.

Il periodo o i periodi di stagionatura dovrebbero essere determinati in base all'analisi del modello della degradazione della sostanza attiva e dei metaboliti.

Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

7.1.3.3. Studi al lisimetro o studi di lisciviazione in campo.

Scopo dei test.

I test devono fornire dati su

- la mobilità nel suolo,
- la lisciviabilità da acque sotterranee,
- la possibile distribuzione nel suolo.

Necessità dei test.

Occorrerà far ricorso al parere di esperti per decidere se sia necessario o meno effettuare studi al lisimetro o di lisciviazione in campo, tenendo conto dei risultati degli studi di degradazione e di mobilità nonché dei valori delle concentrazioni ambientali previste nelle acque freatiche ( $PEC_{GW}$ ) calcolate secondo quanto prescritto all'allegato III, parte A, punto 9. Il tipo e le condizioni dello studio da effettuare dovranno essere discussi con le competenti autorità.

Condizioni sperimentali.

E' necessaria la massima accuratezza nella progettazione degli impianti sperimentali e dei singoli studi in modo da garantire che i risultati ottenuti possano essere utilizzati ai fini della valutazione. Gli studi devono prevedere condizioni realistiche di casi peggiori possibili, tenendo conto del tipo di suolo, delle condizioni climatiche, delle dosi applicate e della frequenza e del periodo di applicazione.

L'acqua di percolazione attraverso le colonne di terreno deve essere analizzata ad intervalli opportuni e devono essere determinati i residui nel materiale vegetale all'epoca del raccolto. Al termine dei lavori sperimentali deve essere costruito il profilo dei residui nel suolo in almeno cinque strati. Occorre evitare un campionamento intermedio poiché la rimozione di piante (salvo per operazioni di raccolto, secondo la normale pratica agricola) e l'asportazione di zolle o carote di terreno altera le condizioni del processo di lisciviazione.

Devono essere registrate ad intervalli regolari (almeno settimanalmente) le precipitazioni e le temperature del suolo e dell'aria.

- Studi al lisimetro.

#### Condizioni sperimentali.

La profondità minima dei lisimetri dovrebbe essere di 10 cm e quella massima di 130 cm. Le carote di terreno utilizzate non devono essere alterate. Le temperature del suolo devono essere prossime a quelle in campo. Se necessario, si provveda ad una maggiore irrigazione in modo da garantire una crescita ottimale delle piante e una quantità di acqua d'infiltrazione prossima a quella delle regioni per le quali viene richiesta l'autorizzazione. Qualora, per motivi agricoli, il terreno debba essere alterato nel corso dello studio, le corrispondenti operazioni non devono estendersi ad una profondità maggiore di 25 cm.

- Studi di lisciviazione in campo.

#### Condizioni sperimentali.

Devono essere presentati dati sulla superficie freatica dei campi sperimentali. Occorre descrivere dettagliatamente l'eventuale formazione di crepe del terreno osservata nel corso dello studio.

Occorre riservare particolare attenzione al numero e all'ubicazione delle apparecchiature di raccolta delle acque. Il loro posizionamento nel suolo non deve causare rigagnoli di scolo preferenziali.

#### Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

## **7.2. Destino e comportamento nell'acqua e nell'aria.**

### Scopo del test.

I dati forniti insieme con quelli relativi ad uno o più preparati contenenti la sostanza attiva ed altre informazioni pertinenti dovrebbero essere sufficienti per stabilire o poter stimare

- la persistenza in sistemi acquatici (acque e sedimenti di fondo, ivi incluse particelle sospese);
- il livello di rischio per le acque, gli organismi nei sedimenti e l'aria;
- il potenziale di contaminazione delle acque superficiali e delle acque freatiche.

### 7.2.1. Via e velocità di degradazione in sistemi acquatici (se non considerati a punto 2.9).

#### Scopo dei test.

I dati forniti e le informazioni fornite dovrebbero essere sufficienti per

- stabilire l'importanza relativa dei tipi di processo coinvolti (bilancio tra degradazione chimica e biologica);
- se possibile, identificare i singoli componenti presenti;
- stabilire i rapporti relativi dei componenti presenti e la loro distribuzione tra acque (incluse le particelle sospese) e sedimento;
- poter stabilire i residui di rilevanza a cui sono o possono essere esposte specie non bersaglio.

#### 7.2.1.1. Degradazione idrolitica.

##### Necessità del test.

Il test deve essere effettuato sempre per i metaboliti e i prodotti di degradazione e di reazione che in qualsiasi momento sono presenti in una percentuale superiore al 10% della quantità di sostanza attiva aggiunta, a meno che si siano ottenuti dati sufficienti sulla loro degradazione dal test effettuato secondo quanto indicato al punto 2.9.1.

##### Condizioni sperimentali e linea guida per il test.

Vale quanto indicato ai corrispondenti paragrafi del punto 2.9.1.

#### 7.2.1.2. Degradazione fotochimica.

##### Necessità del test.

Il test deve essere effettuato sempre per i metaboliti e i prodotti di degradazione e di reazione che in qualsiasi momento sono presenti in una percentuale superiore al 10% della quantità di sostanza attiva aggiunta, a meno che si siano ottenuti dati sufficienti sulla loro degradazione dal test effettuato conformemente ai punti 2.9.2 e 2.9.3.

##### Condizioni sperimentali e linea guida per il test.

Si applica quanto indicato ai corrispondenti paragrafi del punto 2.9.2 e 2.9.3.

#### 7.2.1.3. Degradazione biologica.

##### 7.2.1.3.1. Biodegradabilità a breve termine.

##### Necessità del test.

Il test deve essere effettuato sempre, salvo se non richiesto ai sensi delle disposizioni della direttiva 67/548/CEE per quanto riguarda la classificazione della sostanza attiva.

Linea guida per il test.

Metodo CEE C4.

##### 7.2.1.3.2. Studio su acque/sedimenti.

##### Necessità del test.

I risultati del test devono essere riportati a meno che si possa comprovare l'impossibilità di contaminazione delle acque di superficie.

Linea guida per il test.

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

#### 7.2.1.4. Degradazione nella zona di saturazione.

##### Necessità del test.

Le velocità di trasformazione, nella zona di saturazione, delle sostanze attive, dei relativi metaboliti e dei prodotti di degradazione e di reazione possono fornire utili informazioni sul destino di queste sostanze nelle acque freatiche.

##### Condizioni sperimentali.

Per decidere se queste informazioni siano necessarie o meno occorre far ricorso al parere di esperti in materia. Prima di eseguire questi studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

#### 7.2.2. Velocità e via di degradazione nell'aria (se non già considerati a punto 2.10).

Le relative disposizioni sono in via di elaborazione.

### **7.3. Definizioni di residuo.**

In base alla composizione chimica dei residui presenti nel suolo, nell'acqua o nell'aria e derivanti dall'utilizzazione (o dall'utilizzazione proposta) di un prodotto fitosanitario contenente la sostanza attiva, deve essere proposta una definizione di residuo, tenendo conto dei livelli ritrovati e della loro rilevanza tossicologica e ambientale.

### **7.4. Dati di monitoraggio.**

Devono essere riportati i dati di monitoraggio sul destino e sul comportamento della sostanza attiva e dei relativi metaboliti e prodotti di degradazione e di reazione.

## 8. STUDI ECOTOSSICOLOGICI (AGGIORNATO DALLA DIRETTIVA 96/12/CE)

### Introduzione

- (i) Le informazioni fornite, insieme con quelle precisate per uno o più preparati contenenti la sostanza attiva, devono essere sufficienti a permettere una valutazione dell'impatto sulle specie non bersaglio (flora e fauna) che potrebbe presentare rischi da esposizione alla sostanza attiva, ai suoi metaboliti ed ai prodotti di reazione e di degradazione, se di rilevanza ambientale. L'impatto può risultare da un'esposizione singola, prolungata o ripetuta e può essere reversibile o irreversibile.
- (ii) Le informazioni fornite relative alla sostanza attiva, insieme con altre informazioni pertinenti e con quelle fornite a riguardo dei preparati che la contengono, devono essere sufficienti per:
  - decidere se la sostanza attiva possa essere inclusa o meno nell'allegato I;
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni da associare all'eventuale inclusione nell'allegato I;
  - permettere una valutazione dei rischi a breve e lungo termine per le specie non bersaglio - popolazioni, comunità e processi - secondo quanto appropriato;
  - classificare la sostanza attiva in base alla sua pericolosità;
  - specificare le precauzioni occorrenti per la protezione delle specie non bersaglio;
  - specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'ambiente, da apporre sull'imballaggio (contenitori).
- (iii) E' necessario che tutti gli effetti potenzialmente dannosi scoperti durante gli studi ecotossicologici di routine siano riportati nella relazione e che, se richiesto dalle autorità competenti, vengano intrapresi ed indicati studi addizionali che si rendessero necessari allo scopo di studiare i probabili meccanismi implicati e di valutare l'importanza di questi effetti. La relazione deve riportare tutti i dati e tutte le informazioni di ordine biologico disponibili e utili per la valutazione del profilo ecotossicologico della sostanza attiva.
- (iv) Le informazioni sul destino e sul comportamento nell'ambiente, ottenute e presentate conformemente ai punti da 7.1 a 7.4, e quelle sui livelli dei residui nelle piante, ottenute e presentate conformemente al punto 6, hanno un'importanza fondamentale per la valutazione dell'impatto sulle specie non bersaglio in quanto, insieme con le informazioni sulla natura del preparato e sulle sue modalità d'uso, definiscono la natura e il grado di esposizione potenziale. Gli studi tossicocinetici e tossicologici e le informazioni presentate ai sensi dei punti da 5.1 a 5.8 forniscono informazioni essenziali per quanto riguarda la tossicità per i vertebrati e i meccanismi implicati.
- (v) Se del caso, si utilizzeranno appropriati metodi statistici per progettare le prove e per analizzare i risultati. La relazione deve riportare nei dettagli l'analisi statistica (per esempio per tutti i valori puntuali stimati devono essere forniti gli intervalli di confidenza, con l'indicazione degli esatti valori di p, anziché la semplice affermazione significativo/non significativo).

## **Sostanza di prova**

- (vi) Deve essere presentato una descrizione dettagliata (specifica tecnica) del materiale usato, come stabilito al punto 1.11. Se le prove vengono effettuate utilizzando sostanza attiva, il materiale impiegato deve corrispondere alla specifica tecnica che verrà usata nella produzione dei preparati per i quali si chiede l'autorizzazione, salvo che venga utilizzato materiale radiomarcato.
- (vii) Qualora gli studi vengano svolti utilizzando sostanza attiva prodotta in laboratorio o in un sistema di produzione di un impianto pilota, gli studi devono essere ripetuti con l'utilizzo della sostanza attiva di produzione industriale, salvo che si possa dimostrare che il materiale usato nelle prove è sostanzialmente uguale ai fini delle prove e della valutazione ecotossicologiche. In caso di incertezza devono essere presentati appropriati studi di connessione in base ai quali si possa decidere se sia necessario ripetere gli studi.
- (viii) Nel caso di studi in cui la somministrazione si protragga nel tempo, si dovrebbe utilizzare preferibilmente una singola partita di sostanza attiva, se la stabilità lo permette.

Tutte le volte che uno studio implica l'uso di dosi differenti, la documentazione deve riportare la relazione esistente tra la dose e gli effetti indesiderati.

- (ix) Per tutti gli studi di ingestione alimentare va riportata la dose media realizzata, inclusa se possibile la dose in mg/kg di peso corporeo. Se le dosi vengono somministrate con la dieta, la sostanza in esame deve essere distribuita in modo uniforme nella dieta.
- (x) Può essere necessario effettuare studi separati per i metaboliti e per prodotti di degradazione o di reazione qualora questi prodotti possano rappresentare un rischio rilevante per organismi non bersaglio ed i loro effetti non possano essere valutati in base ai risultati relativi alla sostanza attiva.

Prima di eseguire tali studi, si deve tener conto delle informazioni di cui ai punti 5, 6 e 7.

## **Organismi di prova**

- (xi) Allo scopo di facilitare la valutazione della significatività dei risultati ottenuti nelle prove, inclusa una stima della tossicità intrinseca e dei fattori che influiscono sulla tossicità, usare, se possibile, lo stesso ceppo di ciascuna specie pertinente (o specie della stessa origine, che deve essere registrata) nelle varie prove di tossicità specificate.

### **8.1 Effetti sugli uccelli.**

#### **8.1.1 Tossicità orale acuta.**

##### Scopo della prova

La prova deve fornire possibilmente i valori di DL<sub>50</sub>, la dose letale di soglia, l'andamento nel tempo della risposta e del recupero ed il NOEL, e deve includere i rilevamenti patologici evidenti pertinenti.

### Necessità della prova

A meno che la sostanza attiva sia destinata ad essere usata unicamente in preparati per uso esclusivo in spazi chiusi (per esempio, serre o locali di magazzinaggio di prodotti alimentari), devono essere studiati gli effetti possibili della sostanza attiva sugli uccelli.

### Condizioni sperimentali

Determinare la tossicità orale acuta della sostanza attiva per una delle specie di quaglie (quaglia giapponese - *Coturnix coturnix japonica* - o Bobwhite - *Colinus virginianus*) o per l'anatra selvatica (*Anas platyrhynchos*). La dose più elevata utilizzata nelle prove non deve superare i 2000 mg/kg di peso corporeo.

### Disciplinare per la prova

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides  
1

## 8.1.2 Tossicità alimentare a breve termine

### Scopo della prova

La prova deve fornire la tossicità alimentare a breve termine [ $CL_{50}$ , concentrazione letale minima (CLM), se possibile concentrazione senza effetto (NOEC), andamento nel tempo della risposta e del recupero] ed includere i rilevamenti patologici evidenti pertinenti.

### Necessità della prova

La tossicità alimentare (5 giorni) della sostanza attiva nei confronti degli uccelli deve sempre venire studiata su una specie, salvo che la relazione includa uno studio condotto secondo le disposizioni del successivo punto 8.1.3. Se il NOEL orale acuto è  $\leq 500$  mg/kg di peso corporeo o se il NOEC a breve termine è  $< 500$  mg/kg di mangime, la prova deve venire eseguita anche su una seconda specie.

### Condizioni sperimentali

La prima specie da studiare deve essere la quaglia o l'anatra selvatica. Se la prova deve essere condotta anche su una seconda specie, questa non deve essere della stessa famiglia della prima specie studiata.

### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo il metodo OCSE 205.

---

(1) Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) 1995. "Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides". ISBN 90-5607-002-9-

### 8.1.3 Tossicità subcronica e riproduzione

#### Scopo della prova

La prova deve fornire la tossicità subcronica e la tossicità riproduttiva della sostanza attiva per gli uccelli.

#### Necessità della prova

La tossicità subcronica e riproduttiva della sostanza attiva nei confronti degli uccelli deve venire studiata salvo che si possa dimostrare l'improbabilità che si verifichi una esposizione continuativa o ripetuta di adulti o l'esposizione di siti di nidificazione durante la stagione riproduttiva.

#### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo il metodo OCSE 206.

## 8.2 **Effetti sugli organismi acquatici.**

I dati relativi alle prove di cui ai punti 8.2.1, 8.2.4 e 8.2.6 devono essere presentati per ogni sostanza attiva, anche se non è previsto che prodotti fitosanitari che la contengono possano raggiungere le acque superficiali nelle condizioni d'uso proposte. Tali dati devono essere presentati ai sensi dell'allegato VI della direttiva 67/548/CEE, in merito alla classificazione della sostanza attiva.

I dati riportati devono essere suffragati da dati analitici sulle concentrazioni della sostanza di prova nel mezzo.

### 8.2.1 Tossicità acuta per i pesci.

#### Scopo della prova

La prova deve fornire la tossicità acuta ( $CL_{50}$ ) e dettagli degli effetti osservati.

#### Necessità della prova

La prova va sempre eseguita.

#### Condizioni sperimentali

La tossicità acuta della sostanza attiva deve essere determinata per la trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) e per una specie ittica di acque calde. Se devono venire eseguite prove con metaboliti o con prodotti di degradazione o di reazione, deve essere usata la specie più sensibile tra le due su cui è stata provata la sostanza attiva.

### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo l'allegato alla direttiva 92/69/CEE della Commissione <sup>(2)</sup>, del 31 luglio 1992, recante diciassettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva del Consiglio 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose, metodo C1.

#### 8.2.2 Tossicità cronica nei pesci.

##### Necessità della prova

Occorre eseguire uno studio di tossicità cronica a meno che si possa motivare l'improbabilità di un'esposizione continuata o ripetuta di pesci oppure a meno che sia disponibile un adeguato studio su meso o microcosmo.

Per stabilire quale test eseguire occorre far riferimento al parere di esperti in materia. In particolare, per una sostanza attiva in merito alla quale vi siano indicazioni di un certo possibile rischio (riguardo alla sua tossicità o la possibile esposizione), il richiedente deve richiedere l'accordo delle competenti autorità circa il tipo di test da eseguire.

L'effettuazione di un test di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita può essere considerata opportuna se il valore BCF è compreso tra 100 e 1000 oppure se il valore EC<sub>50</sub> della sostanza attiva è < 0,1 mg/l.

Può essere adeguata l'esecuzione di un test sul ciclo di vita dei pesci se

- il fattore di bioconcentrazione è > 1000 e l'eliminazione della sostanza attiva durante una fase di depurazione di 14 giorni è < 95%.

oppure se

- la sostanza è stabile in acqua o in sedimenti (DT<sub>90</sub> > 100 giorni).

Non è necessario eseguire un test di tossicità cronica su avannotti se è stato eseguito un test di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita o un test sul ciclo di vita dei pesci; analogamente non è necessario eseguire un test di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita se è stato effettuato un test sul ciclo di vita dei pesci.

#### 8.2.2.1 Prova di tossicità sugli avannotti

##### Scopo della prova

La prova deve fornire gli effetti sulla crescita, sulla soglia per gli effetti letali e per gli effetti osservati, il NOEC e dettagli degli effetti osservati.

##### Condizioni sperimentali

Il test deve essere effettuato su avannotti di trota iridea dopo un'esposizione di 28 giorni alla sostanza attiva. Devono essere ottenuti dati sugli effetti sulla crescita e sul comportamento.

---

(2) O.J. n. L383A, 29.12.1992, p.1

#### 8.2.2.2 Prova di tossicità per i pesci nelle prime fasi di vita

##### Scopo della prova

La prova deve fornire gli effetti sulla crescita, sullo sviluppo e sul comportamento, il NOEC e dettagli degli effetti osservati nei pesci nelle prime fasi di vita.

##### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo il metodo OCSE 210.

#### 8.2.2.3 Prova del ciclo di vita dei pesci

##### Scopo della prova

La prova deve fornire gli effetti sulla riproduzione della generazione parentale e sulla vitalità della generazione filiale.

##### Condizioni sperimentali

Il richiedente deve ottenere preventivamente l'accordo delle competenti autorità circa il tipo e le condizioni di esecuzione di questi studi.

#### 8.2.3 Bioconcentrazione nei pesci.

##### Scopo della prova

La prova deve fornire i fattori di bioconcentrazione (BFC) allo stato stazionario, le costanti di velocità di assunzione e le costanti di velocità di depurazione calcolate per ciascun composto di prova, e limiti di confidenza pertinenti.

##### Necessità della prova

La relazione deve contenere uno studio del potenziale di bioconcentrazione di sostanze attive, di metaboliti e di prodotti di degradazione e di reazione, similmente alla ripartizione nei tessuti grassi (ad esempio  $\log P_{ow} \geq 3$  - vedi punto 2.8 o altre indicazioni pertinenti di bioconcentrazione), salvo che si possa dimostrare l'improbabilità di un'esposizione che comporti bioconcentrazione.

##### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo il metodo OCSE 305E.

#### 8.2.4 Tossicità acuta per gli invertebrati acquatici

##### Scopo della prova

La prova deve fornire la tossicità acuta a 24 e a 48 ore della sostanza attiva, espressa come concentrazione mediana efficace ( $CE_{50}$ ) per l'immobilizzazione e, se possibile, la concentrazione massima che non provoca immobilizzazione.

##### Necessità delle prova

La tossicità acuta deve sempre essere determinata per la *Daphnia* (preferibilmente la *Daphnia magna*). Nel caso che i prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva siano destinati ad essere utilizzati direttamente nelle acque di superficie, la relazione deve contenere dati aggiuntivi su almeno una specie rappresentativa di ciascuno dei gruppi seguenti: insetti acquatici, crostacei acquatici (su una specie non correlata con la *Daphnia*) e molluschi gasteropodi acquatici.

##### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo la direttiva 92/69/CEE, metodo C2.

#### 8.2.5 Tossicità cronica per gli invertebrati acquatici

##### Scopo della prova

La prova deve fornire, se possibile, i valori di  $CE_{50}$  per effetti come l'immobilizzazione e la riproduzione e la concentrazione massima alla quale non si verificano effetti sulla mortalità né sulla riproduzione (NOEC), nonché dettagli degli effetti osservati.

##### Necessità della prova

Occorre eseguire una prova su *Daphnia magna*, e almeno su una specie rappresentativa di insetti acquatici e su una specie di molluschi gasteropodi acquatici, salvo che si possa dimostrare l'improbabilità che si verifichi una esposizione continuativa o ripetuta.

##### Condizioni sperimentali

La prova con la *Daphnia* deve venire continuata per 21 giorni.

##### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo il metodo OCSE 202, parte II.

#### 8.2.6 Effetti sulla crescita delle alghe.

##### Scopo della prova

La prova deve fornire i valori di  $CE_{50}$  per la crescita e la velocità di crescita, i valori di NOEC e dettagli degli effetti osservati.

### Necessità della prova

Riferire sempre eventuali effetti sulla crescita delle alghe causati dalle sostanze attive. Per i diserbanti deve essere effettuato un test su una seconda specie appartenente ad un gruppo tassonomico differente.

### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo la direttiva 92/69/CEE, metodo C3.

## 8.2.7 Effetti sugli organismi nei sedimenti

### Scopo della prova

La prova misura gli effetti sulla sopravvivenza e sullo sviluppo (inclusi gli effetti sulla comparsa di individui adulti, per il Chironomus), i pertinenti valori di CE<sub>50</sub> e di NOEC.

### Necessità della prova

Nel caso che i dati sul destino e sul comportamento ambientale di cui al punto 7 indichino che una sostanza attiva ha buone probabilità di ripartirsi e persistere in sedimenti acquatici, si deve ricorrere al parere di un esperto per decidere se sia necessaria una prova di tossicità acuta o cronica sul sedimento.

Tale parere esperto deve tener conto del fatto che vi siano o meno probabili effetti su invertebrati che vivono nel sedimento in base al confronto dei dati di tossicità acquatica per gli invertebrati CE<sub>50</sub> dei punti 8.2.4 e 8.2.5 con i livelli previsti di sostanza attiva nel sedimento in base ai dati del punto 9 dell'allegato III.

### Condizioni sperimentali

Il richiedente deve preventivamente ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo e le condizioni dello studio da effettuare.

## 8.2.8 Piante acquatiche

Per i diserbanti deve essere effettuato un test su piante acquatiche.

Prima di effettuare gli studi in parola il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo e le condizioni degli studi da effettuare.

## **8.3 Effetti sugli artropodi.**

### 8.3.1 Api

### 8.3.1 Tossicità acuta

### Scopo della prova

La prova deve fornire il valore di DL<sub>50</sub> acuta orale e per contatto della sostanza attiva.

### Necessità della prova

L'impatto potenziale sulle api deve venire studiato salvo che i preparati contenenti la sostanza attiva siano destinati all'uso esclusivo in situazioni nelle quali è improbabile che le api siano esposte, come:

- immagazzinaggio di prodotti alimentari in spazi chiusi;
- concia non sistemica dei semi;
- preparati non sistemici destinati ad essere applicati sul terreno;
- trattamenti per immersione non sistemici per il trapianto di colture e bulbi;
- trattamenti di chiusura e guarigione delle ferite;
- esche rodenticide;
- uso in serre senza impollinatori.

### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo la direttiva EPPO 170.

#### 8.3.1.2 Prova di ingestione sulle larve delle api

##### Scopo della prova

La prova deve fornire informazioni ufficiali sufficienti per valutare possibili rischi per le larve di api, derivanti dall'uso del prodotto fitosanitario.

##### Necessità della prova

La prova deve venire eseguita quando la sostanza attiva può agire come regolatore di crescita degli insetti, a meno che si possa dimostrare l'improbabilità che vi siano esposte larve di api.

##### Disciplinare per la prova

La prova deve venire eseguita secondo il metodo ICPBR (a esempio, P.A. Oomen, A. de Ruijter e J. van der Sten. Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides. EPPO Bulletin, Volume 22, 613-616, 1992).

#### 8.3.2 Altri artropodi

##### Scopo della prova

La prova deve fornire informazioni sufficienti per valutare la tossicità (mortalità ed effetti subletali) della sostanza attiva su specie selezionate di artropodi.

##### Necessità della prova

Si devono studiare gli effetti su artropodi terrestri non bersaglio (ad esempio predatori o parassitoidi di organismi nocivi). Le informazioni ottenute su queste specie possono venire usate anche come indicazione della tossicità potenziale per altre specie non bersaglio viventi nello stesso ambiente. Queste informazioni sono richieste per tutte le

sostanze attive, salvo che i preparati contenenti la sostanza attiva siano destinati all'uso esclusivo in situazioni nelle quali non sono esposti artropodi non bersaglio, come:

- immagazzinaggio di prodotti alimentari in spazi chiusi;
- trattamenti di chiusura e guarigione di ferite;
- esche rodenticide.

#### Condizioni sperimentali

La prova deve venire eseguita inizialmente in laboratorio su un substrato artificiale (cioè una lastra di vetro o sabbia quarzifera, come più appropriato), a meno che si possano prevedere chiaramente effetti nocivi, in base ad altri studi. In tali casi si devono utilizzare substrati più realistici.

La prova deve essere eseguita su due specie standard sensibili, un parassitoide e un acaro predatore (ad esempio *Aphidius rhopalosiphii* e *Typhlodromus pyri*). In aggiunta a queste specie, eseguire la prova anche su altre due specie che siano significative per l'uso previsto della sostanza. Se possibile ed appropriato, queste dovrebbero rappresentare gli altri due gruppi funzionali principali, predatori del terreno e predatori del fogliame. Nel caso si osservino effetti con specie significative per l'uso proposto del prodotto, si possono eseguire prove ulteriori al livello esteso di laboratorio/semicampo. La scelta delle specie significative per la prova deve seguire le proposte contenute in SETAC-Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods. La prova deve essere condotta a tassi equivalenti al tasso massimo raccomandato di applicazione sul campo.

#### Disciplinare per la prova

Se del caso, la prova deve essere eseguita secondo le appropriate indicazioni soddisfacenti almeno ai requisiti di prova come specificato in SETAC-Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods <sup>(3)</sup>.

## 8.4 **Tossicità per i lombrichi**

### 8.4.1 Tossicità acuta

La prova deve fornire il valore di CL<sub>50</sub> della sostanza attiva nei confronti dei lombrichi, se possibile la concentrazione massima che non provoca mortalità e la concentrazione minima che provoca il 100% di mortalità, e deve includere gli effetti morfologici e comportamentali osservati.

#### Necessità della prova

Gli effetti sui lombrichi devono venire studiati nel caso che i preparati contenenti la sostanza attiva vengano applicati al terreno o possano contaminarlo.

---

(3) Da WORKSHOP EUROPEAN STANDARD CHARACTERISTICS OF BENEFICIALS REGULATORY TESTING (ESCORT), 28-30 marzo 1994, ISBN 0 9522535 2 6

### Disciplinare per la prova

Il test deve essere effettuato conformemente a quanto previsto dalla direttiva 87/302/CEE della Commissione <sup>(4)</sup> recante nono adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio ed all'etichettatura delle sostanze pericolose, parte C dell'allegato, tossicità per lombrichi: saggio su terreno artificiale.

#### 8.4.2 Effetti subletali

##### Scopo della prova

La prova deve fornire il NOEC e gli effetti sulla crescita, la riproduzione ed il comportamento.

##### Necessità della prova

Nel caso che, sulla base della modalità d'uso proposta dei preparati contenenti la sostanza attiva o sulla base del suo destino e del suo comportamento nel terreno ( $DT_{90} > 100$  giorni), sia possibile prevedere un'esposizione continuata o ripetuta di lombrichi alla sostanza attiva, od a quantità significative di metaboliti, prodotti di degradazione o prodotti di reazione, si deve ricorrere al parere di un esperto per decidere se possa essere utile una prova subletale.

##### Condizioni sperimentali

La prova deve venire condotta su *Eisenia foetida*.

#### 8.5 Effetti su microorganismi non bersaglio del terreno

##### Scopo della prova

La prova deve fornire dati sufficienti per valutare l'impatto della sostanza attiva sull'attività microbica del terreno in termini di trasformazione dell'azoto e mineralizzazione del carbonio.

##### Necessità della prova

La prova deve venire eseguita nel caso in cui preparati contenenti la sostanza attiva vengano applicati al terreno o lo possano contaminare nelle condizioni d'uso pratiche. Nel caso di sostanze attive destinate all'uso in preparati per la sterilizzazione del terreno, gli studi devono essere organizzati in modo da misurare i tassi di recupero dopo il trattamento.

---

(4) O.J. n. L133, 30.5.1988, p.1

### Condizioni sperimentali

I terreni usati devono essere terreni agricoli appena campionati. I siti da cui viene prelevato il terreno non devono essere stati trattati nei due anni precedenti con alcuna sostanza che possa alterare in modo sostanziale la diversità ed i livelli delle popolazioni microbiche presenti in maniera non transitoria.

### Disciplinare per la prova

SETAC - Procedures for assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides.

#### 8.6 **Effetti su altri organismi non bersaglio (flora e fauna) ritenuti a rischio.**

Fornire un sommario dei dati disponibili da prove preliminari utilizzate per valutare l'attività biologica e per individuare l'intervallo di dosaggio, sia positivi che negativi, che possono fornire informazioni riguardo al possibile impatto su altre specie non bersaglio, sia appartenenti alla flora che alla fauna, insieme con una valutazione critica della loro importanza per l'impatto potenziale su specie non bersaglio.

#### 8.7 **Effetti sui metodi biologici di trattamento delle acque reflue**

Nel caso in cui l'uso di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva possa dar luogo ad effetti nocivi sugli impianti di trattamento delle acque reflue, la relazione deve riportare gli effetti sui metodi biologici di trattamento delle acque reflue.

**PARTE B DELL'ALLEGATO II**  
**(MODIFICATO DALLA DIRETTIVA 2001/36/CE)**

**Introduzione**

- i) Le sostanze attive sono definite all'articolo 2, paragrafo 4; esse comprendono le sostanze chimiche e i microrganismi, compresi i virus.

La presente parte specifica le informazioni da trasmettere per le sostanze attive costituite da microrganismi, compresi i virus.

Ai fini dell'allegato II, parte B, il termine “microrganismi” è utilizzato e definito come segue:

“Entità microbiologica, cellulare o non cellulare, capace di riprodursi o di trasferire materiale genetico”.

Tale definizione si applica, tra l'altro, a batteri, funghi, protozoi, virus e viroidi.

- ii) Per tutti i microrganismi per i quali viene richiesta l'inclusione nell'elenco delle sostanze attive occorre presentare tutte le informazioni e la documentazione pertinenti disponibili allo stato attuale delle conoscenze.

Le informazioni più utili e significative sono fornite dalla caratterizzazione e dall'identificazione del microrganismo. Tali informazioni, definite nelle sezioni da 1 a 3 (identità, proprietà biologiche e altre informazioni), costituiscono la base di valutazione degli effetti sulla salute umana e sull'ambiente.

Di norma vengono richiesti dati recenti relativi a esperimenti tossicologici e/o patologici eseguiti su animali da laboratorio, salvo se il richiedente è in grado di dimostrare, sulla base delle informazioni precedenti, che l'utilizzazione dei microrganismi nelle condizioni proposte non ha effetti nocivi sulla salute dell'uomo o degli animali o sulle acque sotterranee, né un influsso inaccettabile sull'ambiente.

- iii) In attesa dell'adozione di linee guida specifiche a livello internazionale, le informazioni richieste devono essere ottenute applicando i disciplinari per le prove approvati dall'autorità competente (quali ad esempio quelli dell'USEPA <sup>(1)</sup>; ove del caso, occorre modificare i disciplinari per le prove descritti nell'allegato II, parte A, adeguandoli ai microrganismi. Le prove devono comprendere microrganismi attivi e, ove del caso, inattivi, nonché un controllo in bianco.
- iv) Per le prove effettuate occorre fornire una descrizione dettagliata (specifiche) del materiale utilizzato e delle impurezze ivi contenute, conformemente alle disposizioni della sezione 1, punto 1.4. Il materiale utilizzato deve corrispondere alle specifiche applicabili per la fabbricazione dei preparati da autorizzare.

---

<sup>(1)</sup> USEPA Microbial pesticide test guidelines, OPPTS Series 885, February 1996

Qualora gli studi vengano svolti utilizzando microrganismi prodotti in laboratorio o in un sistema di produzione di un impianto pilota, gli studi devono essere ripetuti con l'utilizzo di microrganismi di produzione industriale, salvo che si possa dimostrare che il materiale usato nelle prove è sostanzialmente uguale ai fini delle prove e della valutazione.

- v) Nel caso di microrganismi geneticamente modificati ai sensi della direttiva 90/220/CEE del Consiglio, del 23 aprile 1990, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati <sup>(2)</sup>, occorre presentare una copia della valutazione dei dati relativi al rischio stimato per l'ambiente, come previsto all'articolo 1, paragrafo 3, della direttiva 91/414/CEE.
- vi) Se del caso, i dati devono essere analizzati mediante opportuni metodi statistici. La relazione deve riportare nei dettagli l'analisi statistica (ad esempio, per tutti i valori puntuali stimati devono essere forniti gli intervalli di confidenza, con l'indicazione degli esatti valori di p, anziché la semplice affermazione significativo/non significativo).
- vii) Nel caso di studi in cui la somministrazione si protragga nel tempo, si dovrebbe utilizzare preferibilmente una singola partita di microrganismi, se la stabilità lo permette.  
  
Se gli studi non sono eseguiti utilizzando una singola partita di microrganismi, occorre specificare la similarità delle varie partite.  
  
Tutte le volte che uno studio implica l'uso di dosi differenti, la documentazione deve riportare la relazione esistente tra la dose e gli effetti indesiderati.
- viii) Se è noto che l'azione di protezione fitosanitaria è dovuta all'effetto residuo di una tossina o di un metabolita o se è prevedibile la presenza significativa di tossine o metaboliti non riconducibili all'effetto della sostanza attiva, per tali tossine o metaboliti occorre presentare un fascicolo in conformità con i requisiti dell'allegato II, parte A.

---

<sup>(2)</sup> GU L 117 dell'8.5.1990, pag. 15

## 1. **IDENTITÀ DEL MICRORGANISMO**

L'identificazione e la caratterizzazione del microrganismo forniscono le informazioni più significative e hanno notevole rilevanza ai fini della decisione.

### 1.1. **Richiedente**

Devono essere indicati il nome e l'indirizzo del richiedente (indirizzo permanente nella Comunità) nonché il nome, la qualifica, i numeri di telefono e di telefax della persona da contattare.

Inoltre, nel caso in cui il richiedente disponga di un ufficio, agenzia o rappresentanza nello Stato membro al quale viene presentata la richiesta di inserimento nell'allegato I e nello Stato membro del relatore incaricato dalla Commissione, se diverso dal primo, devono essere indicati il nome e l'indirizzo dell'ufficio locale, agenzia o rappresentanza, nonché il nome, la qualifica, il numero di telefono e di telefax della persona da contattare.

### 1.2. **Produttore**

Deve essere indicato il nome e l'indirizzo del produttore o dei produttori del microrganismo nonché il nome e l'indirizzo di ciascuno stabilimento di produzione. È necessario indicare un punto di contatto (di preferenza un punto di contatto centrale, con nome, numero di telefono e di telefax), che fornisca informazioni aggiornate e risponda ai quesiti riguardanti la tecnologia di produzione, i procedimenti di fabbricazione e la qualità del prodotto (ivi comprese, se del caso, partite singole). Nei casi in cui, a seguito dell'inserimento del microrganismo nell'allegato I, vi siano mutamenti nella sede o nel numero dei produttori, le informazioni richieste devono essere nuovamente notificate alla Commissione e agli Stati membri.

### 1.3. **Nome e descrizione delle specie, caratterizzazione del ceppo**

- i) Il microrganismo deve essere depositato in una collezione di colture internazionalmente riconosciuta e dotato di un numero di registrazione; tali informazioni devono essere notificate.
- ii) Ciascun microrganismo per il quale viene richiesta l'inclusione nell'elenco deve essere identificato e designato con il nome della specie. Occorre indicare il nome scientifico e il gruppo tassonomico, cioè famiglia, genere, specie, ceppo, sierotipo, pathovar e qualsiasi altra denominazione pertinente del microrganismo.  
Va precisato se il microrganismo:
  - è indigeno o non indigeno, a livello della specie, della zona prevista d'applicazione,
  - è un ceppo selvatico,
  - è un mutante spontaneo o indotto,
  - è stato modificato mediante le tecniche descritte nell'allegato IA, parte 2, e nell'allegato IB della direttiva 90/220/CEE, del 23 aprile 1990, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati.

Negli ultimi due casi occorre indicare tutte le differenze note tra il microrganismo modificato e il ceppo selvatico iniziale.

- iii) Per identificare e caratterizzare il microrganismo a livello del ceppo va utilizzata la migliore tecnologia disponibile. Occorre specificare le procedure e i criteri usati per l'identificazione (ad esempio morfologia, biochimica, sierologia, identificazione molecolare).
- iv) Occorre indicare il nome comune o i nomi alternativi o sostitutivi e, se del caso, i nomi in codice utilizzati durante lo sviluppo.
- v) Occorre indicare i rapporti con agenti patogeni noti.

#### 1.4. **Specifiche del materiale utilizzato per la fabbricazione di prodotti formulati**

##### 1.4.1. Tenore del microrganismo

Occorre indicare il tenore minimo o massimo del microrganismo nel materiale utilizzato per la fabbricazione di prodotti formulati, espresso in termini adeguati, quali il numero di unità attive per volume o peso o in qualsiasi altro modo pertinente per il microrganismo considerato.

Nei casi in cui le informazioni disponibili fornite si riferiscano ad un sistema di produzione pilota, esse dovranno essere nuovamente comunicate alla Commissione e agli Stati membri una volta che siano stati definiti metodi e procedimenti di produzione su scala industriale, nel caso che il cambiamento del sistema di produzione si traduca in una diversa specificazione della purezza.

##### 1.4.2. Identità e tenore di impurezze, additivi, microrganismi contaminanti

Per quanto possibile, è auspicabile che i prodotti fitosanitari non contengano contaminanti (compresi i microrganismi contaminanti). Il livello e la natura di contaminanti ammissibili vanno stabiliti dall'autorità competente sulla base di una valutazione dei rischi.

Ove sia possibile e utile, occorre comunicare l'identità e il tenore massimo (espresso con l'idonea unità di misura) di tutti i microrganismi contaminanti. Ove possibile, i dati relativi all'identità devono essere forniti conformemente a quanto specificato nell'allegato II, parte B, sezione 1, punto 1.3.

Occorre identificare e caratterizzare, in diversi stati o stadi di crescita del microrganismo (cfr. allegato II B, punto viii dell'introduzione), i metaboliti rilevanti (cioè che rappresentano un potenziale fattore di rischio per la salute umana e/o l'ambiente) prodotti dal microrganismo.

Ove del caso, occorre fornire informazioni particolareggiate su tutti i componenti, quali condensati, terreni di coltura, ecc.

Per le impurezze chimiche che rappresentano un rischio per la salute umana e/o l'ambiente occorre indicare l'identità e il tenore massimo, espressi in termini adeguati.

Per gli additivi occorre specificare l'identità e il tenore espresso in g/kg.

I dati relativi all'identità di sostanze chimiche quali additivi devono essere forniti conformemente a quanto specificato nell'allegato II, parte A, sezione 1, punto 1.10.

#### 1.4.3. Profilo analitico delle partite

Ove del caso, occorre comunicare i dati di cui all'allegato II, parte A, sezione 1, punto 1.11, utilizzando unità di misura adeguate.

## 2. **PROPRIETÀ BIOLOGICHE DEL MICRORGANISMO**

### 2.1. **Storia del microrganismo e suoi usi. Presenza in natura e distribuzione geografica**

Occorre presentare la familiarità del microrganismo, intesa come la disponibilità di conoscenze pertinenti.

#### 2.1.1. Antecedenti

Occorre presentare gli antecedenti del microrganismo e la sua utilizzazione (prove/progetti di ricerca o utilizzazione commerciale).

#### 2.1.2. Origine e presenza in natura

Devono essere indicate la regione geografica e la posizione nell'ecosistema (ad esempio la pianta o l'animale ospite, o il terreno in cui il microrganismo è stato isolato), precisando il metodo di isolamento utilizzato. Le informazioni riguardanti la presenza in natura del microrganismo nell'ambiente di cui trattasi vanno fornite, se possibile, a livello del ceppo.

Nel caso di un mutante o di un microrganismo geneticamente modificato (ai sensi dell'allegato IA, parte 2, e allegato IB, della direttiva 90/220/CEE), occorre fornire informazioni dettagliate sulla sua produzione e sul suo isolamento, nonché gli elementi atti a distinguerlo chiaramente dal ceppo originario selvatico.

### 2.2. **Informazioni sull'organismo/sugli organismi bersaglio**

#### 2.2.1. Descrizione dell'organismo/degli organismi bersaglio

Se del caso, è necessario precisare gli organismi nocivi sui quali agisce il prodotto.

#### 2.2.2. Meccanismo di azione

Occorre indicare il principale meccanismo d'azione, specificando inoltre a tale riguardo se il microrganismo produce una tossina avente un effetto residuo sull'organismo bersaglio. In questo caso occorre descrivere il meccanismo d'azione della tossina.

Ove del caso, occorre fornire informazioni riguardanti il punto di infezione e il modo di penetrazione nell'organismo bersaglio, nonché le sue fasi sensibili. I risultati di eventuali studi sperimentali devono essere documentati.

Occorre precisare le possibili vie di assorbimento (contatto, ingestione, inalazione) del microrganismo o dei suoi metaboliti (in particolare le tossine). È altresì necessario specificare se il microrganismo o i suoi metaboliti si trasferiscano o meno nelle piante e, se del caso, come avviene tale trasferimento.

In case di effetto patogeno sull'organismo bersaglio, occorre precisare la dose infettiva (dose necessaria per infettare una specie bersaglio con l'effetto desiderato) e la trasmissibilità [possibilità di diffusione del microrganismo nella popolazione bersaglio, ma anche da una specie bersaglio ad un'altra specie (bersaglio)] a seguito dell'applicazione nelle condizioni di utilizzazione proposte.

### 2.3. **Spettro di specificità dell'ospite ed effetti su specie diverse dall'organismo nocivo bersaglio**

È necessario fornire tutte le informazioni disponibili sugli effetti su organismi non bersaglio nella zona di possibile propagazione del microrganismo, segnalando anche la presenza di organismi non bersaglio strettamente collegati alle specie bersaglio o particolarmente esposti.

È necessario comunicare eventuali esperienze riguardanti la tossicità del microrganismo o dei suoi metaboliti per l'uomo o gli animali, precisando se l'organismo è in grado di colonizzare o di invadere essere umani o animali (compresi i soggetti immunodepressi) e se ha effetti patogeni. Occorre altresì segnalare qualsiasi esperienza atta a rivelare se il microrganismo o i suoi derivati sono irritanti per la pelle, gli occhi o gli organi respiratori di esseri umani o animali o se possono provocare reazioni allergiche in caso di contatto cutaneo o di inalazione.

### 2.4. **Stadi di sviluppo/ciclo di vita del microrganismo**

Devono essere fornite informazioni riguardanti il ciclo di vita del microrganismo, i casi descritti di simbiosi e di parassitismo, i competitori, i predatori, ecc., compresi gli organismi ospiti, nonché i vettori per i virus.

Occorre precisare il tempo di generazione e il tipo di riproduzione del microrganismo.

Devono essere fornite informazioni sulle fasi di riposo, e la loro durata di vita, la virulenza e il potenziale infettivo del microrganismo.

Occorre indicare se, nelle varie fasi di sviluppo successive alla liberazione, il microrganismo può produrre metaboliti, tra cui tossine potenzialmente pericolose per la salute umana e/o l'ambiente.

### 2.5. **Infettività, capacità di diffusione e di colonizzazione**

Devono essere fornite informazioni sulla persistenza del microrganismo e sul suo ciclo di vita nelle condizioni ambientali caratteristiche dell'impiego previsto, segnalando inoltre se esso è particolarmente sensibile a determinate componenti ambientali (ad es. raggi ultravioletti, suolo, acqua).

Occorre indicare le condizioni ambientali (temperatura, pH, umidità, nutrienti, ecc.) necessarie per la sopravvivenza, la riproduzione, la colonizzazione, la lesione (anche di tessuti umani) e l'efficacia del microrganismo.

Va segnalata la presenza di fattori specifici di virulenza.

Deve essere determinato l'intervallo di temperature nel quale è possibile la proliferazione del microrganismo, precisando la temperatura minima, massima e ottimale. Tali informazioni sono di particolare utilità per studiare gli effetti sulla salute umana (sezione 5).

Occorre altresì indicare eventuali effetti prodotti da fattori quali la temperatura, i raggi ultravioletti, il pH e la presenza di talune sostanze sulla stabilità delle tossine in questione.

Vanno fornite informazioni sulle possibili vie di dispersione del microrganismo (attraverso l'aria particelle di polvere o aerosol o attraverso organismi ospiti che fungono da vettori).

## **2.6. Rapporti con agenti patogeni noti per le piante, gli animali o per l'uomo**

È necessario indicare l'eventuale esistenza di una o più specie del genere del microrganismo attivo e, se del caso, dei contaminanti, che hanno un effetto patogeno noto sull'uomo, gli animali, le colture agrarie o altre specie non bersaglio, precisando il tipo di malattia cagionata. Occorre indicare se sia possibile, e in che modo, distinguere chiaramente il microrganismo attivo dalle specie patogene.

## **2.7. Stabilità genetica e fattori che la influenzano**

Ove del caso occorre fornire informazioni sulla stabilità genetica (ad esempio tasso di mutazione dei caratteri relativi al meccanismo d'azione o assorbimento di materiale genetico esogeno) nelle condizioni ambientali dell'uso proposto.

Occorre altresì fornire dati sulla capacità del microrganismo di trasferire materiale genetico ad altri microrganismi, nonché di produrre effetti patogeni sui vegetali, gli animali o l'uomo. Se il microrganismo presenta elementi genetici supplementari, va indicata la stabilità dei caratteri codificati.

## **2.8. Informazioni sulla produzione di metaboliti (in particolare tossine)**

Se altri ceppi appartenenti alla stessa specie microbica del ceppo che forma oggetto della domanda producono metaboliti (in particolare tossine) che, durante o a seguito dell'applicazione, hanno effetti inaccettabili sulla salute dell'uomo e/o sull'ambiente, occorre specificare la natura e la struttura della sostanza prodotta, la sua presenza all'interno o all'esterno della cellula, la sua stabilità, il suo meccanismo d'azione (precisando i fattori esogeni ed endogeni necessari per l'azione del microrganismo), nonché i suoi effetti sull'uomo, sugli animali o su altre specie non bersaglio.

È necessario descrivere le condizioni di produzione del metabolita o dei metaboliti (in particolare tossine).

Vanno fornite tutte le informazioni disponibili riguardanti il meccanismo in base al quale i microrganismi regolano la produzione del metabolita o dei metaboliti, nonché l'influenza che i metaboliti prodotti esercitano sul meccanismo d'azione del microrganismo.

## 2.9. **Antibiotici e altri agenti antimicrobici**

Molti microrganismi producono sostanze antibiotiche. Occorre evitare qualsiasi interferenza con l'impiego di antibiotici nella medicina umana o veterinaria in ogni stadio dello sviluppo di un prodotto fitosanitario microbico.

Occorre fornire informazioni sulla resistenza o la sensibilità del microrganismo agli antibiotici o ad altri agenti antimicrobici, con particolare riguardo alla stabilità dei geni che codificano per la resistenza antibiotica, salvo qualora si possa dimostrare che il microrganismo non ha effetti nocivi sulla salute dell'uomo o degli animali, o che non può trasferire la propria resistenza agli antibiotici e ad altri agenti antimicrobici.

### 3. **ALTRE INFORMAZIONI SUL MICRORGANISMO**

#### **Introduzione**

- i) È necessario precisare le finalità, la dose e le modalità d'impiego effettive o proposte dei preparati contenenti il microrganismo.
- ii) Le informazioni fornite devono specificare i normali metodi e le normali precauzioni di manipolazione, conservazione e trasporto del microrganismo.
- iii) Gli studi, i dati e le informazioni presentati devono dimostrare l'idoneità delle misure proposte ad affrontare eventuali situazioni d'emergenza.
- iv) Le informazioni e i dati in questione sono necessari per ciascun microrganismo, salvo in caso di indicazione diversa.

#### 3.1. **Funzione**

La funzione biologica della sostanza deve essere specificata scegliendola fra le seguenti:

- battericida,
- fungicida,
- insetticida,
- acaricida,
- molluschicida,
- nematocida,
- erbicida,
- altro (specificare).

#### 3.2. **Campo di impiego previsto**

Il campo o i campi di impiego attuali e quelli proposti per i preparati contenenti il microrganismo devono essere specificati scegliendoli tra i seguenti:

- uso in campo, per agricoltura, orticoltura, silvicoltura e viticoltura,
- colture protette (per esempio in serra),
- aree di svago (parchi pubblici, ecc.),
- diserbante in zone non coltivate,
- giardinaggio domestico,
- piante da interni,
- conservazione di prodotti immagazzinati,
- altro (specificare).

### 3.3. **Colture o prodotti protetti o trattati**

È necessario precisare l'impiego attuale e previsto su colture, gruppi di colture, vegetali o prodotti vegetali protetti.

### 3.4. **Metodo di produzione e controllo della qualità**

Occorre fornire una descrizione particolareggiata del metodo di produzione del microrganismo in grande scala.

Il richiedente deve garantire un controllo permanente della qualità sia del metodo/processo di produzione che del prodotto. In particolare, va sorvegliata l'insorgenza di qualsiasi modificazione spontanea delle principali caratteristiche del microrganismo, nonché la presenza/assenza di contaminanti significativi. È opportuno indicare i criteri applicabili al controllo di qualità della produzione.

Occorre descrivere e specificare le tecniche utilizzate per assicurare l'uniformità del prodotto e i metodi di prova finalizzati alla normalizzazione, conservazione e purezza del microrganismo (ad esempio HACCP).

### 3.5. **Informazioni sull'eventuale sviluppo di resistenza dell'organismo/degli organismi bersaglio**

È necessario fornire informazioni sull'eventuale sviluppo di resistenza o resistenza incrociata dell'organismo o degli organismi bersaglio, descrivendo, ove possibile, opportune strategie di prevenzione.

### 3.6. **Metodi per prevenire la perdita di virulenza del ceppo madre del microrganismo**

È necessario illustrare i metodi atti a prevenire la perdita di virulenza delle colture iniziali, nonché qualsiasi altro metodo eventualmente disponibile inteso a prevenire la perdita di efficacia del microrganismo sulle specie bersaglio.

### 3.7. **Metodi e precauzioni raccomandati per la manipolazione, l'immagazzinamento, il trasporto o in caso di incendio**

Per ciascun microrganismo deve essere presentata una scheda di dati di sicurezza simile a quella prescritta per le sostanze chimiche attive dall'articolo 27 della direttiva 67/548/CEE<sup>(3)</sup>.

### 3.8. **Metodi di distruzione o di decontaminazione**

In molti casi il sistema preferibile, oppure l'unico possibile per uno smaltimento sicuro di microrganismi, materiali o imballaggi contaminati consiste nell'incenerimento controllato effettuato in un inceneritore autorizzato.

---

<sup>(3)</sup> Cfr. doc. 6853/VI/98, "Concise outline report of the 1st peer review meeting on micro-organisms".

Deve essere fornita una descrizione particolareggiata dei metodi utilizzati per eliminare in modo sicuro il microrganismo o, se necessario, per ucciderlo prima di eliminarlo, nonché dei sistemi di smaltimento degli imballaggi e dei materiali contaminati. È necessario fornire dati atti a determinare l'efficacia e la sicurezza di siffatti metodi.

### 3.9. **Misure in caso di incidente**

Devono essere specificate le procedure utilizzate per rendere innocuo il microrganismo nell'ambiente (per esempio nell'acqua o nel suolo) in caso di incidente.

#### 4. METODI ANALITICI

##### Introduzione

La presente sezione verte esclusivamente sui metodi analitici prescritti per i controlli post-registrazione e a fini di sorveglianza.

Tutti i parametri relativi alla valutazione dei rischi possono formare oggetto di controlli successivamente all'approvazione. Ciò vale in particolar modo nel caso in cui una domanda verta su (ceppi di) microrganismi non indigeni della zona prevista d'applicazione. Per i metodi analitici impiegati ai fini dell'elaborazione di dati, in conformità della presente direttiva, o per altri scopi, il richiedente deve giustificare il metodo utilizzato; se necessario, verranno impartite apposite istruzioni per questo tipo di metodi, sulla base degli stessi requisiti prescritti per i metodi impiegati a fini di controllo post-registrazione e di sorveglianza.

Devono essere fornite descrizioni di metodi comprendenti informazioni particolareggiate sulle attrezzature e i materiali utilizzati e le condizioni necessarie. Deve essere segnalata l'applicabilità di qualsiasi metodo internazionalmente riconosciuto.

Ove possibile, questi metodi devono essere semplici, economici e basati sull'impiego di apparecchiature comunemente disponibili.

Per i metodi d'analisi dei microrganismi e dei loro residui occorre inoltre fornire dati relativi alla specificità, alla linearità, alla precisione e alla ripetibilità, in conformità dell'allegato II, parte A, punti 4.1 e 4.2.

Ai fini della presente sezione si applicano le seguenti definizioni:

Impurezze	Qualsiasi componente (compresi microrganismi contaminanti e/o sostanze chimiche) diverso dal microrganismo specificato, derivante dal processo di fabbricazione o da una degradazione durante la conservazione
Impurezze rilevanti	Impurezze, secondo la precedente definizione, che costituiscono un rischio per la salute umana o animale e/o l'ambiente
Metaboliti	Comprendono i prodotti risultanti da reazioni di degradazione e di biosintesi che avvengono all'interno del microrganismo o di altri organismi utilizzati per produrre il microrganismo considerato
Metaboliti rilevanti	Metaboliti che costituiscono un rischio per la salute umana o animale e/o per l'ambiente
Residui	Microrganismi vitali e sostanze elaborate da questi microrganismi in quantità significative, che persistono dopo

la scomparsa dei microrganismi e costituiscono un rischio per la salute umana o animale e/o per l'ambiente.

Devono essere forniti, su richiesta, i seguenti campioni:

- i) campioni del microrganismo prodotto,
- ii) metodi di analisi dei metaboliti rilevanti (specialmente le tossine) e/o di altri componenti compresi nella definizione di residuo,
- iii) se disponibili, campioni delle sostanze di riferimento delle impurezze rilevanti.

#### 4.1. **Metodi per l'analisi del microrganismo prodotto**

- Metodi per l'identificazione del microrganismo.
- Metodi per ottenere informazioni sulla possibile variabilità del ceppo madre/microrganismo attivo.
- Metodi per differenziare i mutanti del microrganismo dal ceppo selvatico originario.
- Metodi per stabilire e controllare la purezza del ceppo dal quale sono stati prodotti i vari lotti.
- Metodi per determinare il tenore del microrganismo nel materiale usato per la fabbricazione dei prodotti formulati e metodi per dimostrare che i microrganismi contaminanti sono presenti a livelli accettabili.
- Metodi per la determinazione di impurezze rilevanti nel materiale fabbricato.
- Metodi per verificare l'assenza e quantificare (con idonei limiti di determinazione) la presenza di eventuali patogeni per l'uomo e i mammiferi.
- Metodi per determinare la stabilità all'immagazzinamento e la conservabilità del microrganismo, ove del caso.

#### 4.2. **Metodi per determinare e quantificare i residui (vitali o non vitali)**

- del microrganismo attivo/dei microrganismi attivi,
- dei metaboliti rilevanti (specialmente le tossine),

sulle e/o nelle colture agrarie, negli alimenti per l'uomo e per gli animali, nei tessuti e liquidi biologici umani e animali, nel suolo, nell'acqua (comprese l'acqua potabile, le acque sotterranee e le acque superficiali) e nell'aria, secondo i casi.

Si raccomanda di includere anche metodi analitici per determinare il tenore o l'attività dei prodotti proteici, quali l'analisi delle colture in fase esponenziale e dei surnatanti in test su cellule animali.

## 5. EFFETTI SULLA SALUTE UMANA

### Introduzione

- i) Le informazioni disponibili sulle proprietà del microrganismo e degli organismi corrispondenti (sezioni 1-3), compresi rapporti medici e sanitari, possono essere sufficienti per determinare se il microrganismo può avere un effetto (infettivo/patogeno/tossico) sulla salute umana o meno.
- ii) Le informazioni fornite, insieme con quelle relative ad uno o più preparati contenenti il microrganismo, devono essere sufficienti a consentire una valutazione del rischio per l'uomo, direttamente o indirettamente associato alla manipolazione e all'utilizzazione di prodotti fitosanitari contenenti il microrganismo, del rischio per l'uomo conseguente alla manipolazione di prodotti trattati, nonché del rischio per l'uomo derivante da tracce di residui o contaminanti contenuti negli alimenti e nell'acqua. Inoltre, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:
  - poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I,
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni a cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato I,
  - (dopo l'inclusione) definire adeguate informazioni in materia di rischio e di sicurezza per la protezione dell'uomo, degli animali e dell'ambiente da apporre sull'imballaggio (contenitori),
  - precisare le misure di pronto soccorso e le opportune misure diagnostiche e terapeutiche in caso di infezione o di altri effetti nocivi nell'uomo.
- iii) Tutti gli effetti riscontrati nel corso delle ricerche devono essere riportati. Possono essere necessari studi supplementari al fine di individuare il probabile meccanismo d'azione e valutare l'importanza di tali effetti.
- iv) In tutti gli studi deve essere indicata la dose reale massima somministrata, espressa in unità che formano colonie per kg di peso corporeo (cfu/kg) e in altre unità adeguate.
- v) La valutazione del microrganismo deve essere effettuata secondo uno schema in più fasi.

La prima fase (fase I) comprende le informazioni di base disponibili e gli studi di base che devono essere effettuati per tutti i microrganismi. Occorre far ricorso al parere di un esperto per definire caso per caso un idoneo programma di sperimentazione. Di norma vengono richiesti dati recenti relativi a esperimenti convenzionali tossicologici e/o patologici eseguiti su animali da laboratorio, salvo se il richiedente è in grado di dimostrare, sulla base delle informazioni precedenti, che l'utilizzazione del microrganismo nelle condizioni proposte non ha effetti nocivi sulla salute dell'uomo o degli animali. In attesa dell'adozione di orientamenti specifici a livello internazionale, le informazioni richieste saranno ottenute applicando i disciplinari di prova esistenti (ad es. US PA, OPPTS).

Se i test della Fase I evidenziano effetti nocivi sulla salute, si eseguono gli studi relativi alla Fase II. Il tipo di indagine da effettuare è determinato in funzione degli effetti osservati in Fase I. Prima di eseguire questi studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

## **FASE I**

### **5.1. Informazioni di base**

Sono richieste informazioni di base sulla capacità dei microrganismi di determinare effetti negativi, per esempio la capacità di colonizzare, di provocare danni e di produrre tossine e altri metaboliti rilevanti.

#### **5.1.1. Dati medici**

Fatte salve le disposizioni dell'articolo 5 della direttiva 80/1107/CEE del Consiglio, del 27 novembre 1980, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro <sup>(4)</sup>, e degli articoli da 5 a 17 della direttiva 90/679/CEE del Consiglio, del 16 novembre 1990, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro <sup>(5)</sup>, devono essere fornite, se disponibili, informazioni e dati sperimentali utili per il riconoscimento dei sintomi di infezione o di patogenicità e per la valutazione dell'efficacia delle misure terapeutiche e di primo intervento. Se del caso, dovrebbe essere studiata, riportandone i risultati, l'efficacia dei potenziali antagonisti.

Si devono indicare gli eventuali metodi per distruggere il microrganismo o per renderlo inoffensivo (cfr. sezione 3, punto 3.8).

Se disponibili e se sufficientemente attendibili, sono di particolare utilità dati e informazioni inerenti agli effetti dell'esposizione dell'uomo, per confermare la validità delle estrapolazioni e delle conclusioni concernenti gli organi bersaglio, la virulenza e la reversibilità degli effetti nocivi. Questi dati possono essere ottenuti in seguito ad esposizione professionale o accidentale.

#### **5.1.2. Controlli medici sul personale dello stabilimento di produzione**

Devono essere presentate relazioni sui programmi di controllo sanitario sui lavoratori del settore, con informazioni particolareggiate sulla struttura del programma e sull'esposizione al microrganismo. Tali relazioni dovrebbero contenere, ove possibile, dati sul meccanismo d'azione del microrganismo, nonché eventuali dati relativi a persone esposte negli impianti di fabbricazione o dopo applicazione del microrganismo (ad esempio in prove di efficacia).

Particolare attenzione va prestata ai soggetti sensibili, ad esempio per precedenti malattie, assunzione di medicinali, immunodeficienza, gravidanza o allattamento.

#### **5.1.3. Eventuali osservazioni su sensibilizzazione/allergenicità**

Devono essere fornite le informazioni disponibili sulla sensibilizzazione e sulla risposta allergenica di lavoratori - tra cui addetti agli impianti di fabbricazione, agricoltori e

---

<sup>(4)</sup> G U L 327 del 3.12.1980, pag. 8.

<sup>(5)</sup> G U L 374 del 31.12.1990, pag. 1.

ricercatori - e di altre persone esposte al microrganismo, specificando eventualmente l'incidenza dei casi d'ipersensibilità e di sensibilizzazione cronica. Queste informazioni devono inoltre precisare la frequenza, il livello e la durata dell'esposizione, i sintomi osservati ed altre osservazioni cliniche pertinenti. Si dovrà indicare se i lavoratori sono stati sottoposti a prove allergiche o anamnesi per eventuali sintomi di allergia.

#### 5.1.4. Osservazione diretta, ad esempio casi clinici

Devono essere presentate le relazioni disponibili, tratte dalla letteratura - in particolare da pubblicazioni scientifiche o da rapporti ufficiali - e basate su casi clinici, concernenti il microrganismo in questione od organismi affini appartenenti allo stesso gruppo tassonomico, unitamente ai rapporti di eventuali verifiche a posteriori. Queste relazioni, particolarmente utili, dovrebbero contenere descrizioni complete della natura, del livello e della durata dell'esposizione, dei sintomi clinici osservati, delle misure terapeutiche e di primo intervento applicate, nonché le misurazioni e le osservazioni effettuate. Riassunti e informazioni frammentarie non sono di particolare utilità.

Se sono stati eseguiti studi su animali, la documentazione relativa ai casi clinici può essere di particolare utilità per confermare o meno la validità delle estrapolazioni dall'animale all'uomo e per individuare effetti dannosi imprevisti specifici dell'uomo.

#### 5.2. Studi di base

Per poter interpretare correttamente i risultati ottenuti, è della massima importanza che i metodi di analisi proposti siano pertinenti dal punto di vista della sensibilità verso la specie, della via di somministrazione, e rilevanti dal punto di vista biologico e tossicologico. La scelta della via di somministrazione del microrganismo in esame dipende dalle principali vie di esposizione umana.

Per valutare gli effetti a medio e lungo termine conseguenti ad un'esposizione acuta, subacuta o semicronica a microrganismi, è necessario attenersi ai metodi descritti nella maggior parte delle guide OCSE, che prevedono il prolungamento degli studi in questione con un periodo di ripresa, al termine del quale si procederà ad un esame macroscopico e microscopico completo della patologia, compresa la ricerca di microrganismi nei tessuti e negli organi. Risulta così agevolata l'interpretazione di taluni effetti ed è possibile riconoscere l'infettività e/o la patogenicità, ciò che a sua volta consente di decidere in merito ad altre questioni quali la necessità di condurre ulteriori studi a lungo termine (cancerogenesi, ecc.; cfr. punto 5.3) e l'opportunità o meno di eseguire studi sui residui (cfr. punto 6.2).

##### 5.2.1. Sensibilizzazione <sup>(6)</sup>

---

<sup>(6)</sup>I metodi disponibili per i saggi di sensibilizzazione cutanea non sono adatti ai microrganismi. La sensibilizzazione per inalazione costituisce probabilmente un problema di portata maggiore rispetto all'esposizione cutanea ai microrganismi, ma finora non esistono metodi di analisi convalidati. È quindi estremamente importante mettere a punto metodi di questo tipo. Nel frattempo, tutti i microrganismi devono essere considerati come potenziali sensibilizzanti. Questo approccio permette di tener conto anche dei soggetti immunodeficienti o altrimenti sensibili (donne incinte, neonati, anziani, ecc.).

### Scopo della prova

Il test deve fornire dati sufficienti per poter determinare la probabilità che il microrganismo provochi reazioni di sensibilizzazione cutanea od inalatoria. Si deve quindi eseguire uno studio di massima azione.

### Necessità della prova <sup>(7)</sup>

Le informazioni sulla sensibilizzazione devono essere documentate.

#### 5.2.2. Tossicità acuta, patogenicità ed infettività

Gli studi, i dati e le informazioni da fornire e da valutare devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti di una singola esposizione al microrganismo e, in particolare, per stabilire o indicare:

- la tossicità, la patogenicità e l'infettività del microrganismo,
- il decorso e le caratteristiche degli effetti, con indicazioni complete sulle alterazioni comportamentali ed eventuali conclusioni macropatologiche post mortem,
- ove possibile, il modello dell'azione tossica,
- il pericolo relativo inerente alle diverse vie di esposizione, e
- le analisi ematiche nell'intero corso delle ricerche, onde valutare l'eliminazione del microrganismo.

Gli effetti tossici/patogeni acuti possono essere accompagnati da infettività e/o da effetti a più lungo termine non osservabili immediatamente. Per poter valutare lo stato di salute, è dunque necessario effettuare studi sul potenziale infettivo del microrganismo legato all'assunzione per via orale, per inalazione e per iniezione intra peritoneale/sottocutanea in mammiferi da sperimentazione.

Nell'ambito degli studi sulla tossicità acuta, sulla patogenicità e sull'infettività, si deve valutare il tasso di eliminazione del microrganismo e/o della tossina attiva negli organi ritenuti rilevanti per l'esame microbico (fegato, reni, milza, polmoni, cervello, sangue e punto di inoculazione).

Le osservazioni, che devono essere effettuate con esperto discernimento scientifico, possono comprendere la numerazione del microrganismo in tutti i tessuti potenzialmente interessati (cioè che presentano lesioni) e negli organi principali (reni, cervello, fegato, polmoni, milza, vescica, sangue, ghiandole linfatiche, tratto gastrointestinale, ghiandola del timo, nonché lesioni nel punto di inoculo) di animali morti o moribondi e al momento del sacrificio intermedio e finale.

I dati ottenuti dai test di tossicità acuta, patogenicità e infettività sono di particolare utilità per valutare i possibili pericoli conseguenti ad incidenti e i rischi a cui si espone il consumatore ad eventuali residui.

---

<sup>(7)</sup> A causa della mancanza di metodi di analisi idonei, tutti i microrganismi saranno considerati come potenziali sensibilizzanti, a meno che il richiedente non intenda dimostrare il carattere non sensibilizzante di un microrganismo, fornendo dati in proposito. Pertanto, la richiesta relativa alla comunicazione di dati non è da considerarsi obbligatorio, bensì facoltativo, a titolo provvisorio.

#### 5.2.2.1. Tossicità orale acuta, patogenicità ed infettività

##### Necessità della prova

Devono essere documentate la tossicità orale acuta, la patogenicità e l'infettività del microrganismo.

#### 5.2.2.2. Tossicità acuta per inalazione, patogenicità ed infettività

##### Necessità della prova

Devono essere documentate la tossicità acuta per via inalatoria<sup>(8)</sup>, la patogenicità e l'infettività del microrganismo.

#### 5.2.2.3. Dose intraperitoneale/sottocutanea singola

Il test intraperitoneale/sottocutaneo è considerato un saggio altamente sensibile che consente di dedurre, in particolare, l'infettività.

##### Necessità della prova

L'inoculazione intraperitoneale è richiesta in ogni caso per tutti i microrganismi. Tuttavia qualora la temperatura massima di proliferazione e di riproduzione sia inferiore a 37 °C, viene richiesto un test di tipo sottocutaneo.

#### 5.2.3. Prova di genotossicità

##### Necessità della prova

Se il microrganismo produce esotossine (cfr. punto 2.8), queste tossine e ogni altro rilevante metabolita presente nel terreno di coltura devono essere sottoposti ad una prova di genotossicità. Per queste prove su tossine e metaboliti si dovrebbe utilizzare, se possibile, la sostanza chimica depurata.

Se dagli studi di base non risulta la formazione di metaboliti tossici, la ricerca sul microrganismo stesso dipenderà dal giudizio degli esperti la validità e pertinenza dei dati di base. Se si tratta di un virus, si dovrà discutere il rischio di mutagenesi per inserzione nelle cellule dei mammiferi o il rischio di cancerogenesi.

##### Scopo della prova

Questi studi sono utili per:

- predire il potenziale genotossico,
- individuare precocemente gli agenti cancerogeni genotossici,

---

<sup>(8)</sup> La prova di inalazione può essere sostituita da uno studio intratracheale.

- chiarire il meccanismo d'azione di alcuni agenti cancerogeni.

È importante che venga adottato un approccio flessibile e che la scelta di ulteriori test venga effettuata in funzione dell'interpretazione dei risultati di ogni fase.

#### Condizioni sperimentali<sup>(9)</sup>

La genotossicità dei microrganismi cellulari sarà studiata, ove possibile, dopo la rottura delle cellule. Si dovrà giustificare il metodo impiegato per la preparazione del campione.

La genotossicità dei virus va studiata su isolati infettivi.

#### 5.2.3.1. Analisi in vitro

##### Necessità della prova

Devono essere descritti i risultati dei test di mutagenesi in vitro (prova batterica di mutazione genica, test di clastogenesi in cellule di mammiferi e test di mutazione genica in cellule di mammiferi).

#### 5.2.4. Coltura di cellule

Questa operazione deve essere documentata per i microrganismi che si riproducono all'interno delle cellule, come virus, viroidi o determinati batteri e protozoi, salvo che le informazioni di cui alle sezioni 1-3 dimostrino chiaramente che il microrganismo non si riproduce negli organismi a sangue caldo. Per la coltura cellulare si useranno cellule o tessuti umani prelevati da organi diversi. La scelta può essere determinata dagli organi bersaglio previsti dopo l'infezione. In mancanza di colture di cellule o tessuti umani o di particolari organi, si possono usare colture di cellule e tessuti di altri mammiferi. Per i virus, una considerazione essenziale è la capacità d'interagire con il genoma umano.

#### 5.2.5. Dati sulla tossicità e la patogenicità a breve termine

##### Scopo della prova

Gli studi relativi alla tossicità a breve termine mirano a fornire dati sulla quantità di microrganismo tollerabile senza effetti tossici nelle condizioni dello studio. Queste ricerche forniscono dati utili sui rischi per i manipolatori e gli utilizzatori di preparati contenenti il microrganismo. In particolare, gli studi di tossicità a breve termine forniscono un quadro essenziale delle eventuali azioni cumulative imputabili al microrganismo e sui rischi per i lavoratori che possono esservi esposti intensivamente. Da questi studi si ottengono inoltre utili informazioni per la programmazione di studi sulla tossicità cronica.

Gli studi, i dati e le informazioni da fornire e da valutare devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti conseguenti ad esposizioni ripetute al microrganismo e, in particolare, per stabilire o indicare:

---

<sup>(9)</sup> Poiché questi metodi di analisi sono stati concepiti per le sostanze chimiche solubili, è necessario adattarli ai microrganismi.

- il rapporto tra dose ed effetto,
- la tossicità del microrganismo, incluso, se possibile, il NOAEL per le tossine,
- se del caso, gli organi bersaglio,
- il decorso e le caratteristiche degli effetti, con indicazioni complete sui mutamenti comportamentali ed eventuali conclusioni macropatologiche post mortem,
- gli effetti tossici specifici e le modificazioni patologiche prodotte,
- se del caso, la persistenza e la reversibilità di taluni effetti tossici osservati, dopo sospensione del dosaggio,
- ove possibile, il modello dell'azione tossica, e
- il pericolo relativo associato alle diverse vie di esposizione.

Nell'ambito degli studi sulla tossicità a breve termine, si deve valutare il tasso di eliminazione del microrganismo dagli organi principali.

Si dovranno includere anche ricerche sui parametri di patogenicità e d'infettività.

#### Necessità della prova

Deve essere documentata la tossicità a breve termine (minimo 28 giorni) del microrganismo.

La scelta delle specie da esaminare deve essere motivata. La scelta della durata dello studio dipende dai dati su tossicità acuta e sulla velocità di eliminazione del microrganismo.

Per decidere quale via di somministrazione sia da preferirsi, ci si atterrà al parere degli esperti.

#### 5.2.5.1. Effetti sulla salute conseguenti a esposizioni ripetute per via inalatoria

I dati concernenti gli effetti sulla salute conseguenti a esposizione ripetuta per via inalatoria sono ritenuti necessari, in particolare, per la valutazione dei rischi nell'ambiente di lavoro. L'esposizione ripetuta potrebbe influire sulla capacità di eliminazione (per esempio resistenza) dell'ospite (uomo). Inoltre, ai fini di una corretta valutazione del rischio, occorre valutare la tossicità a seguito di esposizione ripetuta a contaminanti, terreno di coltura, altri coformulanti e al microrganismo stesso. Si dovrà tenere conto del fatto che i coformulanti presenti nel prodotto fitosanitario possono influenzare la tossicità e l'infettività di un microrganismo.

#### Necessità della prova

Occorrono dati sull'infettività, patogenicità e tossicità a breve termine (per via respiratoria) del microrganismo, salvo se le informazioni disponibili sono sufficienti a valutare gli

effetti sulla salute umana. Ciò dicasi nel caso in cui sia dimostrato che il materiale di prova non ha alcuna frazione inalabile e/o che non è prevista un'esposizione ripetuta.

#### 5.2.6. **Trattamento proposto: pronto soccorso, terapia medica**

Devono essere indicate le misure di pronto soccorso in caso di infezione e in caso di contaminazione oculare.

Devono essere descritti in dettaglio i trattamenti terapeutici da applicare in caso di ingestione o di contaminazione oculare e/o cutanea. Devono essere fornite informazioni - basate sull'esperienza pratica, se disponibili, o su fondamenti teorici, in caso contrario - sull'efficacia di eventuali trattamenti alternativi.

Devono essere fornite informazioni sulla resistenza agli antibiotici.

(FINE DELLA FASE I)

## **FASE II**

### 5.3. **Studi sulla tossicità, patogenicità ed infettività specifiche**

In certi casi può essere necessario effettuare ricerche supplementari per chiarire ulteriormente gli effetti sull'uomo.

In particolare, se i risultati di studi precedenti rivelano che il microrganismo può provocare effetti a lungo termine sulla salute, si dovranno svolgere ricerche sulla tossicità, patogenicità e infettività croniche, sulla cancerogenesi e sulla tossicità riproduttiva. Inoltre, se il microrganismo produce tossine, occorre effettuare studi cinetici.

Questi studi devono essere progettati singolarmente, sulla base dei particolari parametri da osservare e degli obiettivi da conseguire. Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

### 5.4. **Studi in vivo su cellule somatiche**

#### Necessità della prova

Se tutti i risultati delle analisi in vitro sono negativi, si devono effettuare ulteriori prove, prendendo in considerazione altri dati pertinenti. Queste prove possono essere in vivo o in vitro basate su un sistema di metabolismo diverso da quello o da quelli precedentemente considerati.

Se l'esito del test di clastogenesi in vitro è positivo, deve essere effettuato un test in vivo su cellule somatiche (analisi della metafase nel midollo osseo di roditori o test del micronucleo in roditori).

Se l'esito di almeno uno dei test di mutazione genica in vitro è positivo, occorre effettuare un test in vivo della sintesi non programmata del DNA o un test delle macchie (spot test) sul topo.

## 5.5. **Genotossicità - Studi in vivo su cellule germinali**

Scopo e condizioni della prova

Cfr. punto 5.4.

### Necessità della prova

Se l'esito di uno studio in vivo su cellule somatiche è positivo, può essere giustificata una sperimentazione in vivo per determinare gli effetti sulle cellule germinali. La necessità o meno di questi test sarà valutata caso per caso, tenendo conto di altri elementi rilevanti, tra cui l'uso e l'esposizione prevista. Sarebbero necessari test idonei per esaminare l'interazione con il DNA (ad esempio, il saggio dei letali dominanti) con un'eventuale valutazione quantitativa degli effetti ereditari. Data la loro complessità, si ammette che gli studi quantitativi siano necessari solo se fortemente motivati.

(FINE DELLA FASE II)

## 5.6. **Sintesi della tossicità, patogenicità ed infettività nei mammiferi e valutazione complessiva**

Deve essere presentata una sintesi di tutti i dati di cui dal punto 5.1 al punto 5.5, con una loro valutazione particolareggiata e critica, tenendo conto dei pertinenti criteri e orientamenti valutativi e decisionali, con particolare riferimento ai rischi, reali o eventuali, per l'uomo e per gli animali, unitamente ad indicazioni sulla portata, la qualità e l'affidabilità della base di dati.

Si deve spiegare se l'esposizione dell'uomo o degli animali abbia possibili implicazioni dal punto di vista della vaccinazione o del monitoraggio sierologico.

## 6. **RESIDUI IN O SU PRODOTTI TRATTATI, ALIMENTI PER L'UOMO E PER GLI ANIMALI**

### **Introduzione**

- i) Le informazioni fornite, congiuntamente a quelle relative ad uno o più preparati contenenti il microrganismo, devono essere sufficienti per consentire una valutazione dei rischi per l'uomo e/o per gli animali, derivanti dall'esposizione al microrganismo e ai relativi residui e metaboliti (tossine) presenti nei o sui vegetali o prodotti vegetali.
- ii) Inoltre, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:
  - poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE,
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE,
  - se del caso, fissare quantità massime di residui e intervalli pre-raccolta per proteggere i consumatori nonché periodi di attesa per proteggere gli addetti alla manipolazione delle colture e dei prodotti trattati.
- iii) Ai fini della valutazione dei rischi derivanti dai residui, non sono necessari dati sperimentali sui livelli di esposizione ai residui se può essere dimostrato che il microrganismo e i relativi metaboliti non sono pericolosi per l'uomo in concentrazioni come quelle risultanti da un uso autorizzato. Tale dimostrazione può essere suffragata dalla letteratura, dalla sperimentazione empirica o dalle informazioni di cui alle sezioni 1-3 e alla sezione 5.

### 6.1. **Persistenza e probabilità di moltiplicazione nelle colture, nei mangimi e nei prodotti alimentari**

Deve essere presentata una stima documentata della persistenza/competitività del microrganismo e dei metaboliti secondari rilevanti (specialmente tossine) nei o sui vegetali nelle condizioni ambientali che ricorrono durante e dopo l'uso, tenendo conto in particolare delle informazioni di cui alla sezione 2.

Inoltre, nella domanda si dovrà dichiarare in che misura e per quale motivo si ritiene che il microrganismo possa/non possa proliferare nei o sui vegetali o prodotti vegetali, o durante il processo di trasformazione delle materie prime.

### 6.2. **Altre informazioni**

I consumatori possono rimanere esposti per un certo tempo al microrganismo in seguito al consumo di prodotti alimentari trattati. I potenziali effetti sul consumatore devono quindi essere desunti da studi cronici o semicronici, in modo da poter fissare una soglia tossicologica (ad es. la DGA) ai fini della gestione del rischio.

#### 6.2.1. Residui non vitali

Un microrganismo non vitale è un microrganismo non più atto a riprodursi o a trasferire materiale genetico.

Se è stata constatata la persistenza di quantità significative di microrganismi o di metaboliti da essi prodotti, in particolare tossine, conformemente a quanto indicato nella sezione 2, punti 2.4 e 2.5, sarà necessario disporre di dati sperimentali completi sui residui, come previsto nell'allegato II, parte A, sezione 6, qualora le concentrazioni di microrganismi o delle relative tossine nei o sui prodotti alimentari o mangimi trattati siano prevedibilmente superiori a quelle che ricorrono in natura o in un diverso stato fenotipico.

In conformità con la direttiva 91/414/CEE, la conclusione in merito alla differenza tra concentrazioni naturali e un'elevata concentrazione dovuta al trattamento a base di microrganismi deve essere fondata su dati sperimentali e non su estrapolazioni o calcoli ricavati da modelli.

Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

#### 6.2.2. Residui vitali

Se le informazioni di cui al punto 6.1 sembrano rivelare la persistenza di quantità significative di microrganismi nei o sui prodotti trattati, si dovranno analizzare i possibili effetti sull'uomo e/o sugli animali, tranne nel caso che le informazioni di cui alla sezione 5 dimostrino che i microrganismi e i loro metaboliti o i prodotti di degradazione non sono pericolosi per l'uomo in concentrazioni e in forme come quelle risultanti da un uso autorizzato.

In conformità con la direttiva 91/414/CEE, la conclusione in merito alla differenza tra concentrazioni naturali e un'elevata concentrazione dovuta al trattamento a base di microrganismi deve essere fondata su dati sperimentali e non su estrapolazioni o calcoli ricavati da modelli.

La persistenza di residui vitali richiede particolare attenzione se dai paragrafi 2.3, 2.5 o dalla sezione 5 è emersa un'infettività o una patogenicità nei mammiferi, o se qualsiasi altro elemento induce a sospettare un rischio per i consumatori o per i lavoratori. In questo caso, le autorità competenti possono esigere che vengano condotti studi analoghi a quelli descritti nella parte A.

Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

#### 6.3. Sintesi e valutazione del comportamento dei residui sulla base dei dati di cui ai punti 6.1-6.2

## 7. DESTINO E COMPORTAMENTO NELL'AMBIENTE

### Introduzione

- i) Per poter valutare il destino e il comportamento nell'ambiente, occorrono informazioni sull'origine; le proprietà e la sopravvivenza del microrganismo e dei suoi metaboliti residui, nonché sull'uso che se ne intende fare.

Di norma si richiedono dati sperimentali, tranne se si può dimostrare che i dati disponibili sono di per sé sufficienti per realizzare la valutazione in parola. Tale dimostrazione può essere suffragata dalla letteratura, dalla sperimentazione empirica o dalle informazioni di cui alle sezioni 1-6. Particolare interesse riveste la funzione del microrganismo nei processi ecologici (cfr. sezione 2, punto 2.1.2).

- ii) Le informazioni fornite, congiuntamente a quelle relative ad uno o più preparati contenenti il microrganismo e ad altri dati pertinenti, devono essere sufficienti per consentire una valutazione del destino e del comportamento del microrganismo e delle sue tracce residue e tossine, ove siano rilevanti per la salute umana e/o per l'ambiente.

- iii) In particolare, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:

- poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I,
- specificare le opportune condizioni o limitazioni cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato II,
- specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'ambiente, da apporre sull'imballaggio (contenitori),
- prevedere la distribuzione, il destino e il comportamento del microrganismo e dei suoi metaboliti nell'ambiente e i relativi tempi,
- individuare le misure necessarie per ridurre il più possibile la contaminazione dell'ambiente e l'impatto sulle specie non bersaglio.

- iv) I metaboliti rilevanti (cioè che implicano un rischio per la salute umana e/o per l'ambiente) prodotti dall'organismo esaminato in determinate condizioni ambientali devono essere caratterizzati. Se il microrganismo contiene o produce metaboliti rilevanti, potranno essere necessari i dati indicati nell'allegato II, parte A, punto 7, a condizione che si verifichino tutte le circostanze seguenti:

- il metabolita rilevante è stabile all'esterno del microrganismo (cfr. punto 2.8);
- l'eventuale effetto tossico del metabolita è indipendente dalla presenza del microrganismo;
- si presume che il metabolita rilevante sia presente nell'ambiente in concentrazioni notevolmente superiori a quelle esistenti in natura.

- v) Devono essere prese in considerazione le informazioni disponibili sui rapporti con i ceppi selvatici esistenti in natura.
- vi) Prima di eseguire gli studi di seguito descritti, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa la necessità di eseguirli e, secondariamente, circa il tipo di studio da eseguire. Si prenderanno in considerazione anche le informazioni risultanti dalle altre sezioni.

## 7.1. **Persistenza e moltiplicazione**

Se del caso, si forniranno opportune informazioni sulla persistenza e la moltiplicazione del microrganismo in tutti i comparti ambientali, salvo che si possa dimostrare l'improbabilità che un particolare comparto ambientale sia esposto al microrganismo. Particolare attenzione sarà rivolta:

- alla competitività nelle condizioni ambientali che ricorrono durante e dopo l'uso,
- alla dinamica della popolazione in condizioni climatiche estreme, quali si possono verificare a livello regionale o stagionale (estati torride, inverni rigidi, piogge intense), nonché alle pratiche agricole applicate dopo l'uso.

Si indicheranno le quantità stimate del microrganismo durante un lasso di tempo successivo all'uso del prodotto nelle condizioni d'impiego raccomandate.

### 7.1.1. Suolo

Si registreranno i dati sull'attività e sulla dinamica della popolazione in diversi campioni di suolo, coltivato e non, rappresentativi dei suoli tipici delle vari regioni della Comunità in cui il prodotto è utilizzato o se ne prevede l'uso. Per la scelta del suolo, la raccolta e la manipolazione dei campioni, ci si atterrà alle indicazioni che figurano nella parte A, punto 7.1, Introduzione. Se l'organismo in esame va utilizzato in associazione con altri materiali (per esempio lana di roccia), questi vanno inclusi nello spettro analitico.

### 7.1.2. Acqua

Si registreranno i dati sull'attività e sulla dinamica della popolazione in sistemi idrici e di sedimentazione naturale, alla luce e al buio.

### 7.1.3. Aria

In caso di rischio sospetto per gli operatori, i lavoratori o gli astanti, si raccoglieranno informazioni sulle concentrazioni nell'aria.

## 7.2. **Mobilità**

Deve essere valutata la possibilità di diffusione del microrganismo e dei suoi prodotti di degradazione nei vari comparti ambientali, salvo se si può dimostrare l'improbabilità che un particolare comparto ambientale sia esposto al microrganismo. In questo contesto, rivestono particolare interesse l'uso prescritto (pieno campo o serra, applicazione al suolo o sulle colture), le fasi del ciclo vitale, la presenza di vettori, la persistenza e la capacità dell'organismo di colonizzare habitat adiacenti.

La diffusione, la persistenza e le probabili distanze di trasporto richiedono particolare attenzione qualora siano emerse tossicità, infettività o patogenicità, oppure qualsiasi elemento induca a sospettare un rischio per l'uomo, gli animali o l'ambiente. In questo caso, le autorità competenti possono esigere che vengano condotti studi analoghi a quelli descritti nella parte A. Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

## 8. EFFETTI SUGLI ORGANISMI NON BERSAGLIO

### Introduzione

- i) Le informazioni sull'identità, le proprietà biologiche e altre informazioni, che figurano nelle sezioni da 1 a 3 e 7, costituiscono la base di valutazione degli effetti sulle specie non bersaglio. Nella sezione 7 si possono trovare altre informazioni utili sul destino e sul comportamento nell'ambiente e nella sezione 6 sul tenore di residui nei vegetali; questi dati, insieme a quelli concernenti la natura del preparato e le modalità di impiego, definiscono le caratteristiche e la portata dell'esposizione potenziale. I dati di cui alla sezione 5 forniscono preziosi ragguagli quanto agli effetti sui mammiferi e ai relativi meccanismi.

Di norma si richiedono dati sperimentali, tranne se si può dimostrare che i dati disponibili sono di per sé sufficienti per valutare gli effetti sugli organismi non bersaglio.

- ii) La scelta degli organismi non bersaglio per l'esame degli effetti ambientali si baserà sull'identità del microrganismo (compresa la specificità dell'ospite, la modalità d'azione e l'ecologia dell'organismo). Tali conoscenze dovrebbero consentire di scegliere gli organismi idonei da esaminare, ad esempio organismi strettamente affini all'organismo bersaglio.

- iii) Le informazioni fornite, insieme con quelle precisate per uno o più preparati contenenti il microrganismo, devono essere sufficienti per consentire una valutazione dell'impatto sulle specie non bersaglio (flora e fauna) che potrebbero essere soggette a rischi da esposizione al microrganismo, se di rilevanza ambientale.

L'impatto può risultare da un'esposizione singola, prolungata o ripetuta e può essere reversibile o irreversibile.

- iv) Le informazioni fornite relative al microrganismo, insieme con altre informazioni pertinenti e con quelle fornite per uno o più preparati che lo contengono, dovrebbero essere sufficienti per:

- poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I,
- specificare le opportune condizioni o limitazioni cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato I,
- permettere una valutazione dei rischi a breve e lungo termine per le specie non bersaglio – popolazioni, comunità e processi – secondo i casi,
- classificare il microrganismo secondo il danno biologico,
- specificare le precauzioni occorrenti per la protezione delle specie non bersaglio,  
e

- specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi pertinenti relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'ambiente da indicare sull'imballaggio (contenitori).
- v) È necessario che tutti gli effetti potenzialmente dannosi scoperti durante le regolari indagini ecologiche siano riportati nella relazione e che, se richiesto dalle autorità competenti, vengano intrapresi e documentati studi supplementari che si rendessero necessari allo scopo di studiare i probabili meccanismi implicati e di valutare l'importanza di questi effetti. La relazione deve riportare tutti i dati e tutte le informazioni di ordine biologico disponibili e utili per la valutazione del profilo ecologico del microrganismo.
- vi) In tutti gli studi deve essere indicata la dose media realizzata, espressa in cfu/kg di peso corporeo e in altre unità adeguate.
- vii) Può essere necessario effettuare studi separati per i metaboliti rilevanti (specialmente tossine), qualora questi prodotti possano rappresentare un rischio rilevante per organismi non bersaglio e i loro effetti non siano valutabili in base ai risultati relativi al microrganismo. Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competente circa la necessità di eseguirli e, secondariamente, circa il tipo di studio da eseguire. Si prenderanno in considerazione le informazioni risultanti dalle sezioni 5, 6 e 7.
- viii) Allo scopo di facilitare la valutazione della significatività dei risultati ottenuti, nelle varie prove specificate si dovrà utilizzare, se possibile, lo stesso ceppo di ciascuna specie pertinente (o specie della stessa origine registrata).
- ix) Non occorre eseguire le prove se si può dimostrare che l'organismo non bersaglio non sarà esposto al microrganismo. Se viene dimostrato che il microrganismo non ha effetti tossici e non è patogeno né infettivo per i vegetali o per i vertebrati, si dovrà esaminare soltanto la reazione ad opportuni organismi non bersaglio.

### 8.1. **Effetti sugli uccelli**

#### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli uccelli.

### 8.2. **Effetti sugli organismi acquatici**

#### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli organismi acquatici.

#### 8.2.1. Effetti sui pesci

#### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per i pesci.

#### 8.2.2. Effetti sugli invertebrati di acqua dolce

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli invertebrati di acqua dolce.

#### 8.2.3. Effetti sulla crescita delle alghe

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla crescita delle alghe, sul tasso di accrescimento e sulla capacità di recupero.

#### 8.2.4. Effetti sui vegetali diversi dalle alghe

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni circa gli effetti sui vegetali diversi dalle alghe.

### 8.3. **Effetti sulle api**

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per le api.

### 8.4. **Effetti su artropodi diversi dalle api**

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli artropodi diversi dalle api. La scelta delle specie da esaminare sarà determinata dall'uso potenziale del prodotto fitosanitario (per esempio, applicazione sulle foglie o al suolo). Particolare attenzione deve essere rivolta agli organismi utilizzati per la lotta biologica e agli organismi che svolgono un ruolo importante nella difesa integrata contro i parassiti.

### 8.5. **Effetti sui lombrichi**

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per i lombrichi.

#### 8.6. **Effetti su microrganismi non bersagli del terreno**

Deve essere documentato l'impatto su microrganismi non bersaglio rilevanti e sui loro predatori (per esempio protozoi per inoculazione batterica). Per decidere se siano necessari studi supplementari, bisognerà ricorrere al parere di esperti. Ai fini di tale decisione, entreranno in considerazione le informazioni disponibili a titolo della presente e di altre sezioni, in particolare i dati sulla specificità del microrganismo e sull'esposizione prevista. Utili informazioni potranno essere ricavate anche dalle osservazioni condotte nell'ambito delle prove di efficacia. Particolare attenzione sarà rivolta agli organismi utilizzati nella difesa integrata delle colture.

#### 8.7. **Studi supplementari**

Ulteriori studi potrebbero vertere sugli effetti acuti esaminati su altre specie o in altri processi (ad esempio i sistemi fognanti), oppure su fasi superiori come quella cronica, subletale o riproduttiva in organismi non bersaglio selezionati.

Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

## 9. **SINTESI E VALUTAZIONE DELL'IMPATTO AMBIENTALE**

Si dovrà eseguire una sintesi e una valutazione di tutti i dati relativi all'impatto sull'ambiente, secondo le direttive impartite dalle autorità competenti degli Stati membri per quanto riguarda il formato di tali sintesi e valutazioni. Vi dovrà figurare una valutazione particolareggiata e critica di tali dati, tenendo conto dei pertinenti criteri e orientamenti valutativi e decisionali, con particolare riferimento ai rischi, reali o eventuali, per l'uomo e per gli animali, unitamente ad indicazioni sulla portata, la qualità e l'affidabilità della base di dati. In particolare, si dovranno considerare i seguenti aspetti:

- distribuzione e destino nell'ambiente e relativi tempi,
- identificazione di specie e popolazioni non bersaglio a rischio e portata della loro esposizione potenziale,
- definizione delle precauzioni necessarie per evitare o minimizzare la contaminazione dell'ambiente e per proteggere le specie non bersaglio.

**PARTE B DELL'ALLEGATO II  
(MODIFICATO DALLA DIRETTIVA 2001/36/CE)**

**Introduzione**

- i) Le sostanze attive sono definite all'articolo 2, paragrafo 4; esse comprendono le sostanze chimiche e i microrganismi, compresi i virus.

La presente parte specifica le informazioni da trasmettere per le sostanze attive costituite da microrganismi, compresi i virus.

Ai fini dell'allegato II, parte B, il termine "microrganismi" è utilizzato e definito come segue:

"Entità microbiologica, cellulare o non cellulare, capace di riprodursi o di trasferire materiale genetico".

Tale definizione si applica, tra l'altro, a batteri, funghi, protozoi, virus e viroidi.

- ii) Per tutti i microrganismi per i quali viene richiesta l'inclusione nell'elenco delle sostanze attive occorre presentare tutte le informazioni e la documentazione pertinenti disponibili allo stato attuale delle conoscenze.

Le informazioni più utili e significative sono fornite dalla caratterizzazione e dall'identificazione del microrganismo. Tali informazioni, definite nelle sezioni da 1 a 3 (identità, proprietà biologiche e altre informazioni), costituiscono la base di valutazione degli effetti sulla salute umana e sull'ambiente.

Di norma vengono richiesti dati recenti relativi a esperimenti tossicologici e/o patologici eseguiti su animali da laboratorio, salvo se il richiedente è in grado di dimostrare, sulla base delle informazioni precedenti, che l'utilizzazione dei microrganismi nelle condizioni proposte non ha effetti nocivi sulla salute dell'uomo o degli animali o sulle acque sotterranee, né un influsso inaccettabile sull'ambiente.

- iii) In attesa dell'adozione di linee guida specifiche a livello internazionale, le informazioni richieste devono essere ottenute applicando i disciplinari per le prove approvati dall'autorità competente (quali ad esempio quelli dell'USEPA <sup>(1)</sup>; ove del caso, occorre modificare i disciplinari per le prove descritti nell'allegato II, parte A, adeguandoli ai microrganismi. Le prove devono comprendere microrganismi attivi e, ove del caso, inattivi, nonché un controllo in bianco.
- iv) Per le prove effettuate occorre fornire una descrizione dettagliata (specifiche) del materiale utilizzato e delle impurezze ivi contenute, conformemente alle disposizioni della sezione 1, punto 1.4. Il materiale utilizzato deve corrispondere alle specifiche applicabili per la fabbricazione dei preparati da autorizzare.

Qualora gli studi vengano svolti utilizzando microrganismi prodotti in laboratorio o in un sistema di produzione di un impianto pilota, gli studi devono essere ripetuti con

---

<sup>(1)</sup> USEPA Microbial pesticide test guidelines, OPPTS Series 885, February 1996

l'utilizzo di microrganismi di produzione industriale, salvo che si possa dimostrare che il materiale usato nelle prove è sostanzialmente uguale ai fini delle prove e della valutazione.

- v) Nel caso di microrganismi geneticamente modificati ai sensi della direttiva 90/220/CEE del Consiglio, del 23 aprile 1990, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati <sup>(2)</sup>, occorre presentare una copia della valutazione dei dati relativi al rischio stimato per l'ambiente, come previsto all'articolo 1, paragrafo 3, della direttiva 91/414/CEE.
- vi) Se del caso, i dati devono essere analizzati mediante opportuni metodi statistici. La relazione deve riportare nei dettagli l'analisi statistica (ad esempio, per tutti i valori puntuali stimati devono essere forniti gli intervalli di confidenza, con l'indicazione degli esatti valori di p, anziché la semplice affermazione significativo/non significativo).
- vii) Nel caso di studi in cui la somministrazione si protragga nel tempo, si dovrebbe utilizzare preferibilmente una singola partita di microrganismi, se la stabilità lo permette.

Se gli studi non sono eseguiti utilizzando una singola partita di microrganismi, occorre specificare la similarità delle varie partite.

Tutte le volte che uno studio implica l'uso di dosi differenti, la documentazione deve riportare la relazione esistente tra la dose e gli effetti indesiderati.

- viii) Se è noto che l'azione di protezione fitosanitaria è dovuta all'effetto residuo di una tossina o di un metabolita o se è prevedibile la presenza significativa di tossine o metaboliti non riconducibili all'effetto della sostanza attiva, per tali tossine o metaboliti occorre presentare un fascicolo in conformità con i requisiti dell'allegato II, parte A.

## 1. **IDENTITÀ DEL MICRORGANISMO**

L'identificazione e la caratterizzazione del microrganismo forniscono le informazioni più significative e hanno notevole rilevanza ai fini della decisione.

### 1.1. **Richiedente**

Devono essere indicati il nome e l'indirizzo del richiedente (indirizzo permanente nella Comunità) nonché il nome, la qualifica, i numeri di telefono e di telefax della persona da contattare.

Inoltre, nel caso in cui il richiedente disponga di un ufficio, agenzia o rappresentanza nello Stato membro al quale viene presentata la richiesta di inserimento nell'allegato I e nello Stato membro del relatore incaricato dalla Commissione, se diverso dal primo, devono essere indicati il nome e l'indirizzo dell'ufficio locale, agenzia o rappresentanza, nonché il nome, la qualifica, il numero di telefono e di telefax della persona da contattare.

### 1.2. **Produttore**

---

<sup>(2)</sup> GU L 117 dell'8.5.1990, pag. 15

Deve essere indicato il nome e l'indirizzo del produttore o dei produttori del microrganismo nonché il nome e l'indirizzo di ciascuno stabilimento di produzione. È necessario indicare un punto di contatto (di preferenza un punto di contatto centrale, con nome, numero di telefono e di telefax), che fornisca informazioni aggiornate e risponda ai quesiti riguardanti la tecnologia di produzione, i procedimenti di fabbricazione e la qualità del prodotto (ivi comprese, se del caso, partite singole). Nei casi in cui, a seguito dell'inserimento del microrganismo nell'allegato I, vi siano mutamenti nella sede o nel numero dei produttori, le informazioni richieste devono essere nuovamente notificate alla Commissione e agli Stati membri.

### 1.3. Nome e descrizione delle specie, caratterizzazione del ceppo

- i) Il microrganismo deve essere depositato in una collezione di colture internazionalmente riconosciuta e dotato di un numero di registrazione; tali informazioni devono essere notificate.
- ii) Ciascun microrganismo per il quale viene richiesta l'inclusione nell'elenco deve essere identificato e designato con il nome della specie. Occorre indicare il nome scientifico e il gruppo tassonomico, cioè famiglia, genere, specie, ceppo, sierotipo, pathovar e qualsiasi altra denominazione pertinente del microrganismo.  
Va precisato se il microrganismo:
  - è indigeno o non indigeno, a livello della specie, della zona prevista d'applicazione,
  - è un ceppo selvatico,
  - è un mutante spontaneo o indotto,
  - è stato modificato mediante le tecniche descritte nell'allegato IA, parte 2, e nell'allegato IB della direttiva 90/220/CEE, del 23 aprile 1990, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati.

Negli ultimi due casi occorre indicare tutte le differenze note tra il microrganismo modificato e il ceppo selvatico iniziale.

- iii) Per identificare e caratterizzare il microrganismo a livello del ceppo va utilizzata la migliore tecnologia disponibile. Occorre specificare le procedure e i criteri usati per l'identificazione (ad esempio morfologia, biochimica, sierologia, identificazione molecolare).
- iv) Occorre indicare il nome comune o i nomi alternativi o sostitutivi e, se del caso, i nomi in codice utilizzati durante lo sviluppo.
- v) Occorre indicare i rapporti con agenti patogeni noti.

### 1.4. Specifiche del materiale utilizzato per la fabbricazione di prodotti formulati

#### 1.4.1. Tenore del microrganismo

Occorre indicare il tenore minimo o massimo del microrganismo nel materiale utilizzato per la fabbricazione di prodotti formulati, espresso in termini adeguati, quali il numero di unità attive per volume o peso o in qualsiasi altro modo pertinente per il microrganismo considerato.

Nei casi in cui le informazioni disponibili fornite si riferiscano ad un sistema di produzione pilota, esse dovranno essere nuovamente comunicate alla Commissione e agli Stati membri una volta che siano stati definiti metodi e procedimenti di produzione su scala industriale, nel caso che il cambiamento del sistema di produzione si traduca in una diversa specificazione della purezza.

#### 1.4.2. Identità e tenore di impurezze, additivi, microrganismi contaminanti

Per quanto possibile, è auspicabile che i prodotti fitosanitari non contengano contaminanti (compresi i microrganismi contaminanti). Il livello e la natura di contaminanti ammissibili vanno stabiliti dall'autorità competente sulla base di una valutazione dei rischi.

Ove sia possibile e utile, occorre comunicare l'identità e il tenore massimo (espresso con l'idonea unità di misura) di tutti i microrganismi contaminanti. Ove possibile, i dati relativi all'identità devono essere forniti conformemente a quanto specificato nell'allegato II, parte B, sezione 1, punto 1.3.

Occorre identificare e caratterizzare, in diversi stati o stadi di crescita del microrganismo (cfr. allegato II B, punto viii dell'introduzione), i metaboliti rilevanti (cioè che rappresentano un potenziale fattore di rischio per la salute umana e/o l'ambiente) prodotti dal microrganismo.

Ove del caso, occorre fornire informazioni particolareggiate su tutti i componenti, quali condensati, terreni di coltura, ecc.

Per le impurezze chimiche che rappresentano un rischio per la salute umana e/o l'ambiente occorre indicare l'identità e il tenore massimo, espressi in termini adeguati.

Per gli additivi occorre specificare l'identità e il tenore espresso in g/kg.

I dati relativi all'identità di sostanze chimiche quali additivi devono essere forniti conformemente a quanto specificato nell'allegato II, parte A, sezione 1, punto 1.10.

#### 1.4.3. Profilo analitico delle partite

Ove del caso, occorre comunicare i dati di cui all'allegato II, parte A, sezione 1, punto 1.11, utilizzando unità di misura adeguate.

## 2. **PROPRIETÀ BIOLOGICHE DEL MICRORGANISMO**

### 2.1. **Storia del microrganismo e suoi usi. Presenza in natura e distribuzione geografica**

Occorre presentare la familiarità del microrganismo, intesa come la disponibilità di conoscenze pertinenti.

#### 2.1.1. Antecedenti

Occorre presentare gli antecedenti del microrganismo e la sua utilizzazione (prove/progetti di ricerca o utilizzazione commerciale).

#### 2.1.2. Origine e presenza in natura

Devono essere indicate la regione geografica e la posizione nell'ecosistema (ad esempio la pianta o l'animale ospite, o il terreno in cui il microrganismo è stato isolato), precisando il metodo di isolamento utilizzato. Le informazioni riguardanti la presenza in natura del microrganismo nell'ambiente di cui trattasi vanno fornite, se possibile, a livello del ceppo.

Nel caso di un mutante o di un microrganismo geneticamente modificato (ai sensi dell'allegato IA, parte 2, e allegato IB, della direttiva 90/220/CEE), occorre fornire informazioni dettagliate sulla sua produzione e sul suo isolamento, nonché gli elementi atti a distinguerlo chiaramente dal ceppo originario selvatico.

### 2.2. **Informazioni sull'organismo/sugli organismi bersaglio**

#### 2.2.1. Descrizione dell'organismo/degli organismi bersaglio

Se del caso, è necessario precisare gli organismi nocivi sui quali agisce il prodotto.

#### 2.2.2. Meccanismo di azione

Occorre indicare il principale meccanismo d'azione, specificando inoltre a tale riguardo se il microrganismo produce una tossina avente un effetto residuo sull'organismo bersaglio. In questo caso occorre descrivere il meccanismo d'azione della tossina.

Ove del caso, occorre fornire informazioni riguardanti il punto di infezione e il modo di penetrazione nell'organismo bersaglio, nonché le sue fasi sensibili. I risultati di eventuali studi sperimentali devono essere documentati.

Occorre precisare le possibili vie di assorbimento (contatto, ingestione, inalazione) del microrganismo o dei suoi metaboliti (in particolare le tossine). È altresì necessario specificare se il microrganismo o i suoi metaboliti si trasferiscano o meno nelle piante e, se del caso, come avviene tale trasferimento.

In case di effetto patogeno sull'organismo bersaglio, occorre precisare la dose infettiva (dose necessaria per infettare una specie bersaglio con l'effetto desiderato) e la trasmissibilità [possibilità di diffusione del microrganismo nella popolazione bersaglio, ma anche da una specie bersaglio ad un'altra specie (bersaglio)] a seguito dell'applicazione nelle condizioni di utilizzazione proposte.

### 2.3. **Spettro di specificità dell'ospite ed effetti su specie diverse dall'organismo nocivo bersaglio**

È necessario fornire tutte le informazioni disponibili sugli effetti su organismi non bersaglio nella zona di possibile propagazione del microrganismo, segnalando anche la presenza di organismi non bersaglio strettamente collegati alle specie bersaglio o particolarmente esposti.

È necessario comunicare eventuali esperienze riguardanti la tossicità del microrganismo o dei suoi metaboliti per l'uomo o gli animali, precisando se l'organismo è in grado di colonizzare o di invadere essere umani o animali (compresi i soggetti immunodepressi) e se ha effetti patogeni. Occorre altresì segnalare qualsiasi esperienza atta a rivelare se il microrganismo o i suoi derivati sono irritanti per la pelle, gli occhi o gli organi respiratori di esseri umani o animali o se possono provocare reazioni allergiche in caso di contatto cutaneo o di inalazione.

### 2.4. **Stadi di sviluppo/ciclo di vita del microrganismo**

Devono essere fornite informazioni riguardanti il ciclo di vita del microrganismo, i casi descritti di simbiosi e di parassitismo, i competitori, i predatori, ecc., compresi gli organismi ospiti, nonché i vettori per i virus.

Occorre precisare il tempo di generazione e il tipo di riproduzione del microrganismo.

Devono essere fornite informazioni sulle fasi di riposo, e la loro durata di vita, la virulenza e il potenziale infettivo del microrganismo.

Occorre indicare se, nelle varie fasi di sviluppo successive alla liberazione, il microrganismo può produrre metaboliti, tra cui tossine potenzialmente pericolose per la salute umana e/o l'ambiente.

### 2.5. **Infettività, capacità di diffusione e di colonizzazione**

Devono essere fornite informazioni sulla persistenza del microrganismo e sul suo ciclo di vita nelle condizioni ambientali caratteristiche dell'impiego previsto, segnalando inoltre se esso è particolarmente sensibile a determinate componenti ambientali (ad es. raggi ultravioletti, suolo, acqua).

Occorre indicare le condizioni ambientali (temperatura, pH, umidità, nutrienti, ecc.) necessarie per la sopravvivenza, la riproduzione, la colonizzazione, la lesione (anche di tessuti umani) e l'efficacia del microrganismo.

Va segnalata la presenza di fattori specifici di virulenza.

Deve essere determinato l'intervallo di temperature nel quale è possibile la proliferazione del microrganismo, precisando la temperatura minima, massima e ottimale. Tali informazioni sono di particolare utilità per studiare gli effetti sulla salute umana (sezione 5).

Occorre altresì indicare eventuali effetti prodotti da fattori quali la temperatura, i raggi ultravioletti, il pH e la presenza di talune sostanze sulla stabilità delle tossine in questione.

Vanno fornite informazioni sulle possibili vie di dispersione del microrganismo (attraverso l'aria particelle di polvere o aerosol o attraverso organismi ospiti che fungono da vettori).

## **2.6. Rapporti con agenti patogeni noti per le piante, gli animali o per l'uomo**

È necessario indicare l'eventuale esistenza di una o più specie del genere del microrganismo attivo e, se del caso, dei contaminanti, che hanno un effetto patogeno noto sull'uomo, gli animali, le colture agrarie o altre specie non bersaglio, precisando il tipo di malattia cagionata. Occorre indicare se sia possibile, e in che modo, distinguere chiaramente il microrganismo attivo dalle specie patogene.

## **2.7. Stabilità genetica e fattori che la influenzano**

Ove del caso occorre fornire informazioni sulla stabilità genetica (ad esempio tasso di mutazione dei caratteri relativi al meccanismo d'azione o assorbimento di materiale genetico esogeno) nelle condizioni ambientali dell'uso proposto.

Occorre altresì fornire dati sulla capacità del microrganismo di trasferire materiale genetico ad altri microrganismi, nonché di produrre effetti patogeni sui vegetali, gli animali o l'uomo. Se il microrganismo presenta elementi genetici supplementari, va indicata la stabilità dei caratteri codificati.

## **2.8. Informazioni sulla produzione di metaboliti (in particolare tossine)**

Se altri ceppi appartenenti alla stessa specie microbica del ceppo che forma oggetto della domanda producono metaboliti (in particolare tossine) che, durante o a seguito dell'applicazione, hanno effetti inaccettabili sulla salute dell'uomo e/o sull'ambiente, occorre specificare la natura e la struttura della sostanza prodotta, la sua presenza all'interno o all'esterno della cellula, la sua stabilità, il suo meccanismo d'azione (precisando i fattori esogeni ed endogeni necessari per l'azione del microrganismo), nonché i suoi effetti sull'uomo, sugli animali o su altre specie non bersaglio.

È necessario descrivere le condizioni di produzione del metabolita o dei metaboliti (in particolare tossine).

Vanno fornite tutte le informazioni disponibili riguardanti il meccanismo in base al quale i microrganismi regolano la produzione del metabolita o dei metaboliti, nonché l'influenza che i metaboliti prodotti esercitano sul meccanismo d'azione del microrganismo.

## 2.9. **Antibiotici e altri agenti antimicrobici**

Molti microrganismi producono sostanze antibiotiche. Occorre evitare qualsiasi interferenza con l'impiego di antibiotici nella medicina umana o veterinaria in ogni stadio dello sviluppo di un prodotto fitosanitario microbico.

Occorre fornire informazioni sulla resistenza o la sensibilità del microrganismo agli antibiotici o ad altri agenti antimicrobici, con particolare riguardo alla stabilità dei geni che codificano per la resistenza antibiotica, salvo qualora si possa dimostrare che il microrganismo non ha effetti nocivi sulla salute dell'uomo o degli animali, o che non può trasferire la propria resistenza agli antibiotici e ad altri agenti antimicrobici.

### 3. ALTRE INFORMAZIONI SUL MICRORGANISMO

#### Introduzione

- i) È necessario precisare le finalità, la dose e le modalità d'impiego effettive o proposte dei preparati contenenti il microrganismo.
- ii) Le informazioni fornite devono specificare i normali metodi e le normali precauzioni di manipolazione, conservazione e trasporto del microrganismo.
- iii) Gli studi, i dati e le informazioni presentati devono dimostrare l'idoneità delle misure proposte ad affrontare eventuali situazioni d'emergenza.
- iv) Le informazioni e i dati in questione sono necessari per ciascun microrganismo, salvo in caso di indicazione diversa.

#### 3.1. **Funzione**

La funzione biologica della sostanza deve essere specificata scegliendola fra le seguenti:

- battericida,
- fungicida,
- insetticida,
- acaricida,
- molluschicida,
- nematocida,
- erbicida,
- altro (specificare).

#### 3.2. **Campo di impiego previsto**

Il campo o i campi di impiego attuali e quelli proposti per i preparati contenenti il microrganismo devono essere specificati scegliendoli tra i seguenti:

- uso in campo, per agricoltura, orticoltura, silvicoltura e viticoltura,
- colture protette (per esempio in serra),
- aree di svago (parchi pubblici, ecc.),
- diserbante in zone non coltivate,
- giardinaggio domestico,
- piante da interni,
- conservazione di prodotti immagazzinati,
- altro (specificare).

### 3.3. **Colture o prodotti protetti o trattati**

È necessario precisare l'impiego attuale e previsto su colture, gruppi di colture, vegetali o prodotti vegetali protetti.

### 3.4. **Metodo di produzione e controllo della qualità**

Occorre fornire una descrizione particolareggiata del metodo di produzione del microrganismo in grande scala.

Il richiedente deve garantire un controllo permanente della qualità sia del metodo/processo di produzione che del prodotto. In particolare, va sorvegliata l'insorgenza di qualsiasi modificazione spontanea delle principali caratteristiche del microrganismo, nonché la presenza/assenza di contaminanti significativi. È opportuno indicare i criteri applicabili al controllo di qualità della produzione.

Occorre descrivere e specificare le tecniche utilizzate per assicurare l'uniformità del prodotto e i metodi di prova finalizzati alla normalizzazione, conservazione e purezza del microrganismo (ad esempio HACCP).

### 3.5. **Informazioni sull'eventuale sviluppo di resistenza dell'organismo/degli organismi bersaglio**

È necessario fornire informazioni sull'eventuale sviluppo di resistenza o resistenza incrociata dell'organismo o degli organismi bersaglio, descrivendo, ove possibile, opportune strategie di prevenzione.

### 3.6. **Metodi per prevenire la perdita di virulenza del ceppo madre del microrganismo**

È necessario illustrare i metodi atti a prevenire la perdita di virulenza delle colture iniziali, nonché qualsiasi altro metodo eventualmente disponibile inteso a prevenire la perdita di efficacia del microrganismo sulle specie bersaglio.

### 3.7. **Metodi e precauzioni raccomandati per la manipolazione, l'immagazzinamento, il trasporto o in caso di incendio**

Per ciascun microrganismo deve essere presentata una scheda di dati di sicurezza simile a quella prescritta per le sostanze chimiche attive dall'articolo 27 della direttiva 67/548/CEE<sup>(3)</sup>.

### 3.8. **Metodi di distruzione o di decontaminazione**

In molti casi il sistema preferibile, oppure l'unico possibile per uno smaltimento sicuro di microrganismi, materiali o imballaggi contaminati consiste nell'incenerimento controllato effettuato in un inceneritore autorizzato.

Deve essere fornita una descrizione particolareggiata dei metodi utilizzati per eliminare in modo sicuro il microrganismo o, se necessario, per ucciderlo prima di eliminarlo, nonché

---

<sup>(3)</sup> Cfr. doc. 6853/VI/98, "Concise outline report of the 1st peer review meeting on micro-organisms".

dei sistemi di smaltimento degli imballaggi e dei materiali contaminati. È necessario fornire dati atti a determinare l'efficacia e la sicurezza di siffatti metodi.

### 3.9. **Misure in caso di incidente**

Devono essere specificate le procedure utilizzate per rendere innocuo il microrganismo nell'ambiente (per esempio nell'acqua o nel suolo) in caso di incidente.

#### 4. METODI ANALITICI

##### Introduzione

La presente sezione verte esclusivamente sui metodi analitici prescritti per i controlli post-registrazione e a fini di sorveglianza.

Tutti i parametri relativi alla valutazione dei rischi possono formare oggetto di controlli successivamente all'approvazione. Ciò vale in particolar modo nel caso in cui una domanda verta su (ceppi di) microrganismi non indigeni della zona prevista d'applicazione. Per i metodi analitici impiegati ai fini dell'elaborazione di dati, in conformità della presente direttiva, o per altri scopi, il richiedente deve giustificare il metodo utilizzato; se necessario, verranno impartite apposite istruzioni per questo tipo di metodi, sulla base degli stessi requisiti prescritti per i metodi impiegati a fini di controllo post-registrazione e di sorveglianza.

Devono essere fornite descrizioni di metodi comprendenti informazioni particolareggiate sulle attrezzature e i materiali utilizzati e le condizioni necessarie. Deve essere segnalata l'applicabilità di qualsiasi metodo internazionalmente riconosciuto.

Ove possibile, questi metodi devono essere semplici, economici e basati sull'impiego di apparecchiature comunemente disponibili.

Per i metodi d'analisi dei microrganismi e dei loro residui occorre inoltre fornire dati relativi alla specificità, alla linearità, alla precisione e alla ripetibilità, in conformità dell'allegato II, parte A, punti 4.1 e 4.2.

Ai fini della presente sezione si applicano le seguenti definizioni:

Impurezze	Qualsiasi componente (compresi microrganismi contaminanti e/o sostanze chimiche) diverso dal microrganismo specificato, derivante dal processo di fabbricazione o da una degradazione durante la conservazione
Impurezze rilevanti	Impurezze, secondo la precedente definizione, che costituiscono un rischio per la salute umana o animale e/o l'ambiente
Metaboliti	Comprendono i prodotti risultanti da reazioni di degradazione e di biosintesi che avvengono all'interno del microrganismo o di altri organismi utilizzati per produrre il microrganismo considerato
Metaboliti rilevanti	Metaboliti che costituiscono un rischio per la salute umana o animale e/o per l'ambiente
Residui	Microrganismi vitali e sostanze elaborate da questi microrganismi in quantità significative, che persistono dopo la scomparsa dei microrganismi e costituiscono un rischio per la salute umana o animale e/o per l'ambiente.

Devono essere forniti, su richiesta, i seguenti campioni:

- i) campioni del microrganismo prodotto,
- ii) metodi di analisi dei metaboliti rilevanti (specialmente le tossine) e/o di altri componenti compresi nella definizione di residuo,
- iii) se disponibili, campioni delle sostanze di riferimento delle impurezze rilevanti.

#### 4.1. **Metodi per l'analisi del microrganismo prodotto**

- Metodi per l'identificazione del microrganismo.
- Metodi per ottenere informazioni sulla possibile variabilità del ceppo madre/microrganismo attivo.
- Metodi per differenziare i mutanti del microrganismo dal ceppo selvatico originario.
- Metodi per stabilire e controllare la purezza del ceppo dal quale sono stati prodotti i vari lotti.
- Metodi per determinare il tenore del microrganismo nel materiale usato per la fabbricazione dei prodotti formulati e metodi per dimostrare che i microrganismi contaminanti sono presenti a livelli accettabili.
- Metodi per la determinazione di impurezze rilevanti nel materiale fabbricato.
- Metodi per verificare l'assenza e quantificare (con idonei limiti di determinazione) la presenza di eventuali patogeni per l'uomo e i mammiferi.
- Metodi per determinare la stabilità all'immagazzinamento e la conservabilità del microrganismo, ove del caso.

#### 4.2. **Metodi per determinare e quantificare i residui (vitali o non vitali)**

- del microrganismo attivo/dei microrganismi attivi,
- dei metaboliti rilevanti (specialmente le tossine),

sulle e/o nelle colture agrarie, negli alimenti per l'uomo e per gli animali, nei tessuti e liquidi biologici umani e animali, nel suolo, nell'acqua (comprese l'acqua potabile, le acque sotterranee e le acque superficiali) e nell'aria, secondo i casi.

Si raccomanda di includere anche metodi analitici per determinare il tenore o l'attività dei prodotti proteici, quali l'analisi delle colture in fase esponenziale e dei surnatanti in test su cellule animali.

## 5. EFFETTI SULLA SALUTE UMANA

### Introduzione

- i) Le informazioni disponibili sulle proprietà del microrganismo e degli organismi corrispondenti (sezioni 1-3), compresi rapporti medici e sanitari, possono essere sufficienti per determinare se il microrganismo può avere un effetto (infettivo/patogeno/tossico) sulla salute umana o meno.
- ii) Le informazioni fornite, insieme con quelle relative ad uno o più preparati contenenti il microrganismo, devono essere sufficienti a consentire una valutazione del rischio per l'uomo, direttamente o indirettamente associato alla manipolazione e all'utilizzazione di prodotti fitosanitari contenenti il microrganismo, del rischio per l'uomo conseguente alla manipolazione di prodotti trattati, nonché del rischio per l'uomo derivante da tracce di residui o contaminanti contenuti negli alimenti e nell'acqua. Inoltre, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:
  - poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I,
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni a cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato I,
  - (dopo l'inclusione) definire adeguate informazioni in materia di rischio e di sicurezza per la protezione dell'uomo, degli animali e dell'ambiente da apporre sull'imballaggio (contenitori),
  - precisare le misure di pronto soccorso e le opportune misure diagnostiche e terapeutiche in caso di infezione o di altri effetti nocivi nell'uomo.
- iii) Tutti gli effetti riscontrati nel corso delle ricerche devono essere riportati. Possono essere necessari studi supplementari al fine di individuare il probabile meccanismo d'azione e valutare l'importanza di tali effetti.
- iv) In tutti gli studi deve essere indicata la dose reale massima somministrata, espressa in unità che formano colonie per kg di peso corporeo (cfu/kg) e in altre unità adeguate.
- v) La valutazione del microrganismo deve essere effettuata secondo uno schema in più fasi.

La prima fase (fase I) comprende le informazioni di base disponibili e gli studi di base che devono essere effettuati per tutti i microrganismi. Occorre far ricorso al parere di un esperto per definire caso per caso un idoneo programma di sperimentazione. Di norma vengono richiesti dati recenti relativi a esperimenti convenzionali tossicologici e/o patologici eseguiti su animali da laboratorio, salvo se il richiedente è in grado di dimostrare, sulla base delle informazioni precedenti, che l'utilizzazione del microrganismo nelle condizioni proposte non ha effetti nocivi sulla salute dell'uomo o degli animali. In attesa dell'adozione di orientamenti specifici a livello internazionale, le informazioni richieste saranno ottenute applicando i disciplinari di prova esistenti (ad es. US PA, OPPTS).

Se i test della Fase I evidenziano effetti nocivi sulla salute, si eseguono gli studi relativi alla Fase II. Il tipo di indagine da effettuare è determinato in funzione degli effetti osservati in Fase I. Prima di eseguire questi studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

## **FASE I**

### **5.1. Informazioni di base**

Sono richieste informazioni di base sulla capacità dei microrganismi di determinare effetti negativi, per esempio la capacità di colonizzare, di provocare danni e di produrre tossine e altri metaboliti rilevanti.

#### **5.1.1. Dati medici**

Fatte salve le disposizioni dell'articolo 5 della direttiva 80/1107/CEE del Consiglio, del 27 novembre 1980, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro <sup>(4)</sup>, e degli articoli da 5 a 17 della direttiva 90/679/CEE del Consiglio, del 16 novembre 1990, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro <sup>(5)</sup>, devono essere fornite, se disponibili, informazioni e dati sperimentali utili per il riconoscimento dei sintomi di infezione o di patogenicità e per la valutazione dell'efficacia delle misure terapeutiche e di primo intervento. Se del caso, dovrebbe essere studiata, riportandone i risultati, l'efficacia dei potenziali antagonisti.

Si devono indicare gli eventuali metodi per distruggere il microrganismo o per renderlo inoffensivo (cfr. sezione 3, punto 3.8).

Se disponibili e se sufficientemente attendibili, sono di particolare utilità dati e informazioni inerenti agli effetti dell'esposizione dell'uomo, per confermare la validità delle estrapolazioni e delle conclusioni concernenti gli organi bersaglio, la virulenza e la reversibilità degli effetti nocivi. Questi dati possono essere ottenuti in seguito ad esposizione professionale o accidentale.

#### **5.1.2. Controlli medici sul personale dello stabilimento di produzione**

Devono essere presentate relazioni sui programmi di controllo sanitario sui lavoratori del settore, con informazioni particolareggiate sulla struttura del programma e sull'esposizione al microrganismo. Tali relazioni dovrebbero contenere, ove possibile, dati sul meccanismo d'azione del microrganismo, nonché eventuali dati relativi a persone esposte negli impianti di fabbricazione o dopo applicazione del microrganismo (ad esempio in prove di efficacia).

Particolare attenzione va prestata ai soggetti sensibili, ad esempio per precedenti malattie, assunzione di medicinali, immunodeficienza, gravidanza o allattamento.

#### **5.1.3. Eventuali osservazioni su sensibilizzazione/allergenicità**

Devono essere fornite le informazioni disponibili sulla sensibilizzazione e sulla risposta allergenica di lavoratori

---

<sup>(4)</sup> G U L 327 del 3.12.1980, pag. 8.

<sup>(5)</sup> G U L 374 del 31.12.1990, pag. 1.

- tra cui addetti agli impianti di fabbricazione, agricoltori e ricercatori - e di altre persone esposte al microrganismo, specificando eventualmente l'incidenza dei casi d'ipersensibilità e di sensibilizzazione cronica. Queste informazioni devono inoltre precisare la frequenza, il livello e la durata dell'esposizione, i sintomi osservati ed altre osservazioni cliniche pertinenti. Si dovrà indicare se i lavoratori sono stati sottoposti a prove allergiche o anamnesi per eventuali sintomi di allergia.

#### 5.1.4. Osservazione diretta, ad esempio casi clinici

Devono essere presentate le relazioni disponibili, tratte dalla letteratura - in particolare da pubblicazioni scientifiche o da rapporti ufficiali - e basate su casi clinici, concernenti il microrganismo in questione od organismi affini appartenenti allo stesso gruppo tassonomico, unitamente ai rapporti di eventuali verifiche a posteriori. Queste relazioni, particolarmente utili, dovrebbero contenere descrizioni complete della natura, del livello e della durata dell'esposizione, dei sintomi clinici osservati, delle misure terapeutiche e di primo intervento applicate, nonché le misurazioni e le osservazioni effettuate. Riassunti e informazioni frammentarie non sono di particolare utilità.

Se sono stati eseguiti studi su animali, la documentazione relativa ai casi clinici può essere di particolare utilità per confermare o meno la validità delle estrapolazioni dall'animale all'uomo e per individuare effetti dannosi imprevisi specifici dell'uomo.

#### 5.2. Studi di base

Per poter interpretare correttamente i risultati ottenuti, è della massima importanza che i metodi di analisi proposti siano pertinenti dal punto di vista della sensibilità verso la specie, della via di somministrazione, e rilevanti dal punto di vista biologico e tossicologico. La scelta della via di somministrazione del microrganismo in esame dipende dalle principali vie di esposizione umana.

Per valutare gli effetti a medio e lungo termine conseguenti ad un'esposizione acuta, subacuta o semicronica a microrganismi, è necessario attenersi ai metodi descritti nella maggior parte delle guide OCSE, che prevedono il prolungamento degli studi in questione con un periodo di ripresa, al termine del quale si procederà ad un esame macroscopico e microscopico completo della patologia, compresa la ricerca di microrganismi nei tessuti e negli organi. Risulta così agevolata l'interpretazione di taluni effetti ed è possibile riconoscere l'infettività e/o la patogenicità, ciò che a sua volta consente di decidere in merito ad altre questioni quali la necessità di condurre ulteriori studi a lungo termine (cancerogenesi, ecc.; cfr. punto 5.3) e l'opportunità o meno di eseguire studi sui residui (cfr. punto 6.2).

##### 5.2.1. Sensibilizzazione <sup>(6)</sup>

---

<sup>(6)</sup>I metodi disponibili per i saggi di sensibilizzazione cutanea non sono adatti ai microrganismi. La sensibilizzazione per inalazione costituisce probabilmente un problema di portata maggiore rispetto all'esposizione cutanea ai microrganismi, ma finora non esistono metodi di analisi convalidati. È quindi estremamente importante mettere a punto metodi di questo tipo. Nel frattempo, tutti i microrganismi devono essere considerati come potenziali sensibilizzanti. Questo approccio permette di tener conto anche dei soggetti immunodeficienti o altrimenti sensibili (donne incinte, neonati, anziani, ecc.).

### Scopo della prova

Il test deve fornire dati sufficienti per poter determinare la probabilità che il microrganismo provochi reazioni di sensibilizzazione cutanea od inalatoria. Si deve quindi eseguire uno studio di massima azione.

### Necessità della prova <sup>(7)</sup>

Le informazioni sulla sensibilizzazione devono essere documentate.

#### 5.2.2. Tossicità acuta, patogenicità ed infettività

Gli studi, i dati e le informazioni da fornire e da valutare devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti di una singola esposizione al microrganismo e, in particolare, per stabilire o indicare:

- la tossicità, la patogenicità e l'infettività del microrganismo,
- il decorso e le caratteristiche degli effetti, con indicazioni complete sulle alterazioni comportamentali ed eventuali conclusioni macropatologiche post mortem,
- ove possibile, il modello dell'azione tossica,
- il pericolo relativo inerente alle diverse vie di esposizione, e
- le analisi ematiche nell'intero corso delle ricerche, onde valutare l'eliminazione del microrganismo.

Gli effetti tossici/patogeni acuti possono essere accompagnati da infettività e/o da effetti a più lungo termine non osservabili immediatamente. Per poter valutare lo stato di salute, è dunque necessario effettuare studi sul potenziale infettivo del microrganismo legato all'assunzione per via orale, per inalazione e per iniezione intra peritoneale/sottocutanea in mammiferi da sperimentazione.

Nell'ambito degli studi sulla tossicità acuta, sulla patogenicità e sull'infettività, si deve valutare il tasso di eliminazione del microrganismo e/o della tossina attiva negli organi ritenuti rilevanti per l'esame microbico (fegato, reni, milza, polmoni, cervello, sangue e punto di inoculazione).

Le osservazioni, che devono essere effettuate con esperto discernimento scientifico, possono comprendere la numerazione del microrganismo in tutti i tessuti potenzialmente interessati (cioè che presentano lesioni) e negli organi principali (reni, cervello, fegato, polmoni, milza, vescica, sangue, ghiandole linfatiche, tratto gastrointestinale, ghiandola del timo, nonché lesioni nel punto di inoculo) di animali morti o moribondi e al momento del sacrificio intermedio e finale.

I dati ottenuti dai test di tossicità acuta, patogenicità e infettività sono di particolare utilità per valutare i possibili pericoli conseguenti ad incidenti e i rischi a cui si espone il consumatore ad eventuali residui.

---

<sup>(7)</sup> A causa della mancanza di metodi di analisi idonei, tutti i microrganismi saranno considerati come potenziali sensibilizzanti, a meno che il richiedente non intenda dimostrare il carattere non sensibilizzante di un microrganismo, fornendo dati in proposito. Pertanto, la richiesta relativa alla comunicazione di dati non è da considerarsi obbligatorio, bensì facoltativo, a titolo provvisorio.

#### 5.2.2.1. Tossicità orale acuta, patogenicità ed infettività

##### Necessità della prova

Devono essere documentate la tossicità orale acuta, la patogenicità e l'infettività del microrganismo.

#### 5.2.2.2. Tossicità acuta per inalazione, patogenicità ed infettività

##### Necessità della prova

Devono essere documentate la tossicità acuta per via inalatoria<sup>(8)</sup>, la patogenicità e l'infettività del microrganismo.

#### 5.2.2.3. Dose intraperitoneale/sottocutanea singola

Il test intraperitoneale/sottocutaneo è considerato un saggio altamente sensibile che consente di dedurre, in particolare, l'infettività.

##### Necessità della prova

L'inoculazione intraperitoneale è richiesta in ogni caso per tutti i microrganismi. Tuttavia qualora la temperatura massima di proliferazione e di riproduzione sia inferiore a 37 °C, viene richiesto un test di tipo sottocutaneo.

#### 5.2.3. Prova di genotossicità

##### Necessità della prova

Se il microrganismo produce esotossine (cfr. punto 2.8), queste tossine e ogni altro rilevante metabolita presente nel terreno di coltura devono essere sottoposti ad una prova di genotossicità. Per queste prove su tossine e metaboliti si dovrebbe utilizzare, se possibile, la sostanza chimica depurata.

Se dagli studi di base non risulta la formazione di metaboliti tossici, la ricerca sul microrganismo stesso dipenderà dal giudizio degli esperti la validità e pertinenza dei dati di base. Se si tratta di un virus, si dovrà discutere il rischio di mutagenesi per inserzione nelle cellule dei mammiferi o il rischio di cancerogenesi.

##### Scopo della prova

Questi studi sono utili per:

- predire il potenziale genotossico,
- individuare precocemente gli agenti cancerogeni genotossici,
- chiarire il meccanismo d'azione di alcuni agenti cancerogeni.

---

<sup>(8)</sup> La prova di inalazione può essere sostituita da uno studio intratracheale.

È importante che venga adottato un approccio flessibile e che la scelta di ulteriori test venga effettuata in funzione dell'interpretazione dei risultati di ogni fase.

Condizioni sperimentali<sup>(9)</sup>

La genotossicità dei microrganismi cellulari sarà studiata, ove possibile, dopo la rottura delle cellule. Si dovrà giustificare il metodo impiegato per la preparazione del campione.

La genotossicità dei virus va studiata su isolati infettivi.

#### 5.2.3.1. Analisi in vitro

##### Necessità della prova

Devono essere descritti i risultati dei test di mutagenesi in vitro (prova batterica di mutazione genica, test di clastogenesi in cellule di mammiferi e test di mutazione genica in cellule di mammiferi).

#### 5.2.4. Coltura di cellule

Questa operazione deve essere documentata per i microrganismi che si riproducono all'interno delle cellule, come virus, viroidi o determinati batteri e protozoi, salvo che le informazioni di cui alle sezioni 1-3 dimostrino chiaramente che il microrganismo non si riproduce negli organismi a sangue caldo. Per la coltura cellulare si useranno cellule o tessuti umani prelevati da organi diversi. La scelta può essere determinata dagli organi bersaglio previsti dopo l'infezione. In mancanza di colture di cellule o tessuti umani o di particolari organi, si possono usare colture di cellule e tessuti di altri mammiferi. Per i virus, una considerazione essenziale è la capacità d'interagire con il genoma umano.

#### 5.2.5. Dati sulla tossicità e la patogenicità a breve termine

##### Scopo della prova

Gli studi relativi alla tossicità a breve termine mirano a fornire dati sulla quantità di microrganismo tollerabile senza effetti tossici nelle condizioni dello studio. Queste ricerche forniscono dati utili sui rischi per i manipolatori e gli utilizzatori di preparati contenenti il microrganismo. In particolare, gli studi di tossicità a breve termine forniscono un quadro essenziale delle eventuali azioni cumulative imputabili al microrganismo e sui rischi per i lavoratori che possono esservi esposti intensivamente. Da questi studi si ottengono inoltre utili informazioni per la programmazione di studi sulla tossicità cronica.

Gli studi, i dati e le informazioni da fornire e da valutare devono essere sufficienti per poter individuare gli effetti conseguenti ad esposizioni ripetute al microrganismo e, in particolare, per stabilire o indicare:

---

<sup>(9)</sup> Poiché questi metodi di analisi sono stati concepiti per le sostanze chimiche solubili, è necessario adattarli ai microrganismi.

- il rapporto tra dose ed effetto,
- la tossicità del microrganismo, incluso, se possibile, il NOAEL per le tossine,
- se del caso, gli organi bersaglio,
- il decorso e le caratteristiche degli effetti, con indicazioni complete sui mutamenti comportamentali ed eventuali conclusioni macropatologiche post mortem,
- gli effetti tossici specifici e le modificazioni patologiche prodotte,
- se del caso, la persistenza e la reversibilità di taluni effetti tossici osservati, dopo sospensione del dosaggio,
- ove possibile, il modello dell'azione tossica, e
- il pericolo relativo associato alle diverse vie di esposizione.

Nell'ambito degli studi sulla tossicità a breve termine, si deve valutare il tasso di eliminazione del microrganismo dagli organi principali.

Si dovranno includere anche ricerche sui parametri di patogenicità e d'infettività.

#### Necessità della prova

Deve essere documentata la tossicità a breve termine (minimo 28 giorni) del microrganismo.

La scelta delle specie da esaminare deve essere motivata. La scelta della durata dello studio dipende dai dati su tossicità acuta e sulla velocità di eliminazione del microrganismo.

Per decidere quale via di somministrazione sia da preferirsi, ci si atterrà al parere degli esperti.

#### 5.2.5.2. Effetti sulla salute conseguenti a esposizioni ripetute per via inalatoria

I dati concernenti gli effetti sulla salute conseguenti a esposizione ripetuta per via inalatoria sono ritenuti necessari, in particolare, per la valutazione dei rischi nell'ambiente di lavoro. L'esposizione ripetuta potrebbe influire sulla capacità di eliminazione (per esempio resistenza) dell'ospite (uomo). Inoltre, ai fini di una corretta valutazione del rischio, occorre valutare la tossicità a seguito di esposizione ripetuta a contaminanti, terreno di coltura, altri coformulanti e al microrganismo stesso. Si dovrà tenere conto del fatto che i coformulanti presenti nel prodotto fitosanitario possono influenzare la tossicità e l'infettività di un microrganismo.

#### Necessità della prova

Occorrono dati sull'infettività, patogenicità e tossicità a breve termine (per via respiratoria) del microrganismo, salvo se le informazioni disponibili sono sufficienti a valutare gli

effetti sulla salute umana. Ciò dicasi nel caso in cui sia dimostrato che il materiale di prova non ha alcuna frazione inalabile e/o che non è prevista un'esposizione ripetuta.

#### 5.2.6. **Trattamento proposto: pronto soccorso, terapia medica**

Devono essere indicate le misure di pronto soccorso in caso di infezione e in caso di contaminazione oculare.

Devono essere descritti in dettaglio i trattamenti terapeutici da applicare in caso di ingestione o di contaminazione oculare e/o cutanea. Devono essere fornite informazioni - basate sull'esperienza pratica, se disponibili, o su fondamenti teorici, in caso contrario - sull'efficacia di eventuali trattamenti alternativi.

Devono essere fornite informazioni sulla resistenza agli antibiotici.

(FINE DELLA FASE I)

## **FASE II**

#### 5.3. **Studi sulla tossicità, patogenicità ed infettività specifiche**

In certi casi può essere necessario effettuare ricerche supplementari per chiarire ulteriormente gli effetti sull'uomo.

In particolare, se i risultati di studi precedenti rivelano che il microrganismo può provocare effetti a lungo termine sulla salute, si dovranno svolgere ricerche sulla tossicità, patogenicità e infettività croniche, sulla cancerogenesi e sulla tossicità riproduttiva. Inoltre, se il microrganismo produce tossine, occorre effettuare studi cinetici.

Questi studi devono essere progettati singolarmente, sulla base dei particolari parametri da osservare e degli obiettivi da conseguire. Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

#### 5.4. **Studi in vivo su cellule somatiche**

##### Necessità della prova

Se tutti i risultati delle analisi in vitro sono negativi, si devono effettuare ulteriori prove, prendendo in considerazione altri dati pertinenti. Queste prove possono essere in vivo o in vitro basate su un sistema di metabolismo diverso da quello o da quelli precedentemente considerati.

Se l'esito del test di clastogenesi in vitro è positivo, deve essere effettuato un test in vivo su cellule somatiche (analisi della metafase nel midollo osseo di roditori o test del micronucleo in roditori).

Se l'esito di almeno uno dei test di mutazione genica in vitro è positivo, occorre effettuare un test in vivo della sintesi non programmata del DNA o un test delle macchie (spot test) sul topo.

## 5.5. **Genotossicità - Studi in vivo su cellule germinali**

### Scopo e condizioni della prova

Cfr. punto 5.4.

### Necessità della prova

Se l'esito di uno studio in vivo su cellule somatiche è positivo, può essere giustificata una sperimentazione in vivo per determinare gli effetti sulle cellule germinali. La necessità o meno di questi test sarà valutata caso per caso, tenendo conto di altri elementi rilevanti, tra cui l'uso e l'esposizione prevista. Sarebbero necessari test idonei per esaminare l'interazione con il DNA (ad esempio, il saggio dei letali dominanti) con un'eventuale valutazione quantitativa degli effetti ereditari. Data la loro complessità, si ammette che gli studi quantitativi siano necessari solo se fortemente motivati.

(FINE DELLA FASE II)

## 5.7. **Sintesi della tossicità, patogenicità ed infettività nei mammiferi e valutazione complessiva**

Deve essere presentata una sintesi di tutti i dati di cui dal punto 5.1 al punto 5.5, con una loro valutazione particolareggiata e critica, tenendo conto dei pertinenti criteri e orientamenti valutativi e decisionali, con particolare riferimento ai rischi, reali o eventuali, per l'uomo e per gli animali, unitamente ad indicazioni sulla portata, la qualità e l'affidabilità della base di dati.

Si deve spiegare se l'esposizione dell'uomo o degli animali abbia possibili implicazioni dal punto di vista della vaccinazione o del monitoraggio sierologico.

6. **RESIDUI IN O SU PRODOTTI TRATTATI, ALIMENTI PER L'UOMO E PER GLI ANIMALI**

**Introduzione**

- i) Le informazioni fornite, congiuntamente a quelle relative ad uno o più preparati contenenti il microrganismo, devono essere sufficienti per consentire una valutazione dei rischi per l'uomo e/o per gli animali, derivanti dall'esposizione al microrganismo e ai relativi residui e metaboliti (tossine) presenti nei o sui vegetali o prodotti vegetali.
- ii) Inoltre, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:
  - poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE,
  - specificare le opportune condizioni o limitazioni cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE,
  - se del caso, fissare quantità massime di residui e intervalli pre-raccolta per proteggere i consumatori nonché periodi di attesa per proteggere gli addetti alla manipolazione delle colture e dei prodotti trattati.
- iii) Ai fini della valutazione dei rischi derivanti dai residui, non sono necessari dati sperimentali sui livelli di esposizione ai residui se può essere dimostrato che il microrganismo e il relativi metaboliti non sono pericolosi per l'uomo in concentrazioni come quelle risultanti da un uso autorizzato. Tale dimostrazione può essere suffragata dalla letteratura, dalla sperimentazione empirica o dalle informazioni di cui alle sezioni 1-3 e alla sezione 5.

6.1. **Persistenza e probabilità di moltiplicazione nelle colture, nei mangimi e nei prodotti alimentari**

Deve essere presentata una stima documentata della persistenza/competitività del microrganismo e dei metaboliti secondari rilevanti (specialmente tossine) nei o sui vegetali nelle condizioni ambientali che ricorrono durante e dopo l'uso, tenendo conto in particolare delle informazioni di cui alla sezione 2.

Inoltre, nella domanda si dovrà dichiarare in che misura e per quale motivo si ritiene che il microrganismo possa/non possa proliferare nei o sui vegetali o prodotti vegetali, o durante il processo di trasformazione delle materie prime.

6.2. **Altre informazioni**

I consumatori possono rimanere esposti per un certo tempo al microrganismo in seguito al consumo di prodotti alimentari trattati. I potenziali effetti sul consumatore devono quindi essere desunti da studi cronici o semicronici, in modo da poter fissare una soglia tossicologica (ad es. la DGA) ai fini della gestione del rischio.

#### 6.2.1. Residui non vitali

Un microrganismo non vitale è un microrganismo non più atto a riprodursi o a trasferire materiale genetico.

Se è stata constatata la persistenza di quantità significative di microrganismi o di metaboliti da essi prodotti, in particolare tossine, conformemente a quanto indicato nella sezione 2, punti 2.4 e 2.5, sarà necessario disporre di dati sperimentali completi sui residui, come previsto nell'allegato II, parte A, sezione 6, qualora le concentrazioni di microrganismi o delle relative tossine nei o sui prodotti alimentari o mangimi trattati siano prevedibilmente superiori a quelle che ricorrono in natura o in un diverso stato fenotipico.

In conformità con la direttiva 91/414/CEE, la conclusione in merito alla differenza tra concentrazioni naturali e un'elevata concentrazione dovuta al trattamento a base di microrganismi deve essere fondata su dati sperimentali e non su estrapolazioni o calcoli ricavati da modelli.

Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

#### 6.2.2. Residui vitali

Se le informazioni di cui al punto 6.1 sembrano rivelare la persistenza di quantità significative di microrganismi nei o sui prodotti trattati, si dovranno analizzare i possibili effetti sull'uomo e/o sugli animali, tranne nel caso che le informazioni di cui alla sezione 5 dimostrino che i microrganismi e i loro metaboliti o i prodotti di degradazione non sono pericolosi per l'uomo in concentrazioni e in forme come quelle risultanti da un uso autorizzato.

In conformità con la direttiva 91/414/CEE, la conclusione in merito alla differenza tra concentrazioni naturali e un'elevata concentrazione dovuta al trattamento a base di microrganismi deve essere fondata su dati sperimentali e non su estrapolazioni o calcoli ricavati da modelli.

La persistenza di residui vitali richiede particolare attenzione se dai paragrafi 2.3, 2.5 o dalla sezione 5 è emersa un'infettività o una patogenicità nei mammiferi, o se qualsiasi altro elemento induce a sospettare un rischio per i consumatori o per i lavoratori. In questo caso, le autorità competenti possono esigere che vengano condotti studi analoghi a quelli descritti nella parte A.

Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

### 6.3. Sintesi e valutazione del comportamento dei residui sulla base dei dati di cui ai punti 6.1-6.2

## 7. DESTINO E COMPORTAMENTO NELL'AMBIENTE

### Introduzione

- ii) Per poter valutare il destino e il comportamento nell'ambiente, occorrono informazioni sull'origine; le proprietà e la sopravvivenza del microrganismo e dei suoi metaboliti residui, nonché sull'uso che se ne intende fare.

Di norma si richiedono dati sperimentali, tranne se si può dimostrare che i dati disponibili sono di per sé sufficienti per realizzare la valutazione in parola. Tale dimostrazione può essere suffragata dalla letteratura, dalla sperimentazione empirica o dalle informazioni di cui alle sezioni 1-6. Particolare interesse riveste la funzione del microrganismo nei processi ecologici (cfr. sezione 2, punto 2.1.2).

- ii) Le informazioni fornite, congiuntamente a quelle relative ad uno o più preparati contenenti il microrganismo e ad altri dati pertinenti, devono essere sufficienti per consentire una valutazione del destino e del comportamento del microrganismo e delle sue tracce residue e tossine, ove siano rilevanti per la salute umana e/o per l'ambiente.

- iii) In particolare, le informazioni fornite devono essere sufficienti per:

- poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I,
- specificare le opportune condizioni o limitazioni cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato II,
- specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'ambiente, da apporre sull'imballaggio (contenitori),
- prevedere la distribuzione, il destino e il comportamento del microrganismo e dei suoi metaboliti nell'ambiente e i relativi tempi,
- individuare le misure necessarie per ridurre il più possibile la contaminazione dell'ambiente e l'impatto sulle specie non bersaglio.

- vii) I metaboliti rilevanti (cioè che implicano un rischio per la salute umana e/o per l'ambiente) prodotti dall'organismo esaminato in determinate condizioni ambientali devono essere caratterizzati. Se il microrganismo contiene o produce metaboliti rilevanti, potranno essere necessari i dati indicati nell'allegato II, parte A, punto 7, a condizione che si verifichino tutte le circostanze seguenti:

- il metabolita rilevante è stabile all'esterno del microrganismo (cfr. punto 2.8);
- l'eventuale effetto tossico del metabolita è indipendente dalla presenza del microrganismo;
- si presume che il metabolita rilevante sia presente nell'ambiente in concentrazioni notevolmente superiori a quelle esistenti in natura.

- viii) Devono essere prese in considerazione le informazioni disponibili sui rapporti con i ceppi selvatici esistenti in natura.
- ix) Prima di eseguire gli studi di seguito descritti, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa la necessità di eseguirli e, secondariamente, circa il tipo di studio da eseguire. Si prenderanno in considerazione anche le informazioni risultanti dalle altre sezioni.

## 7.1. **Persistenza e moltiplicazione**

Se del caso, si forniranno opportune informazioni sulla persistenza e la moltiplicazione del microrganismo in tutti i comparti ambientali, salvo che si possa dimostrare l'improbabilità che un particolare comparto ambientale sia esposto al microrganismo. Particolare attenzione sarà rivolta:

- alla competitività nelle condizioni ambientali che ricorrono durante e dopo l'uso,
- alla dinamica della popolazione in condizioni climatiche estreme, quali si possono verificare a livello regionale o stagionale (estati torride, inverni rigidi, piogge intense), nonché alle pratiche agricole applicate dopo l'uso.

Si indicheranno le quantità stimate del microrganismo durante un lasso di tempo successivo all'uso del prodotto nelle condizioni d'impiego raccomandate.

### 7.1.1. Suolo

Si registreranno i dati sull'attività e sulla dinamica della popolazione in diversi campioni di suolo, coltivato e non, rappresentativi dei suoli tipici delle vari regioni della Comunità in cui il prodotto è utilizzato o se ne prevede l'uso. Per la scelta del suolo, la raccolta e la manipolazione dei campioni, ci si atterrà alle indicazioni che figurano nella parte A, punto 7.1, Introduzione. Se l'organismo in esame va utilizzato in associazione con altri materiali (per esempio lana di roccia), questi vanno inclusi nello spettro analitico.

### 7.1.2. Acqua

Si registreranno i dati sull'attività e sulla dinamica della popolazione in sistemi idrici e di sedimentazione naturale, alla luce e al buio.

### 7.1.3. Aria

In caso di rischio sospetto per gli operatori, i lavoratori o gli astanti, si raccoglieranno informazioni sulle concentrazioni nell'aria.

## 7.2. **Mobilità**

Deve essere valutata la possibilità di diffusione del microrganismo e dei suoi prodotti di degradazione nei vari comparti ambientali, salvo se si può dimostrare l'improbabilità che un particolare comparto ambientale sia esposto al microrganismo. In questo contesto, rivestono particolare interesse l'uso prescritto (pieno campo o serra, applicazione al suolo o sulle colture), le fasi del ciclo vitale, la presenza di vettori, la persistenza e la capacità dell'organismo di colonizzare habitat adiacenti.

La diffusione, la persistenza e le probabili distanze di trasporto richiedono particolare attenzione qualora siano emerse tossicità, infettività o patogenicità, oppure qualsiasi elemento induca a sospettare un rischio per l'uomo, gli animali o l'ambiente. In questo caso, le autorità competenti possono esigere che vengano condotti studi analoghi a quelli descritti nella parte A. Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

## 8. EFFETTI SUGLI ORGANISMI NON BERSAGLIO

### Introduzione

- x) Le informazioni sull'identità, le proprietà biologiche e altre informazioni, che figurano nelle sezioni da 1 a 3 e 7, costituiscono la base di valutazione degli effetti sulle specie non bersaglio. Nella sezione 7 si possono trovare altre informazioni utili sul destino e sul comportamento nell'ambiente e nella sezione 6 sul tenore di residui nei vegetali; questi dati, insieme a quelli concernenti la natura del preparato e le modalità di impiego, definiscono le caratteristiche e la portata dell'esposizione potenziale. I dati di cui alla sezione 5 forniscono preziosi ragguagli quanto agli effetti sui mammiferi e ai relativi meccanismi.

Di norma si richiedono dati sperimentali, tranne se si può dimostrare che i dati disponibili sono di per sé sufficienti per valutare gli effetti sugli organismi non bersaglio.

- xi) La scelta degli organismi non bersaglio per l'esame degli effetti ambientali si baserà sull'identità del microrganismo (compresa la specificità dell'ospite, la modalità d'azione e l'ecologia dell'organismo). Tali conoscenze dovrebbero consentire di scegliere gli organismi idonei da esaminare, ad esempio organismi strettamente affini all'organismo bersaglio.

- xii) Le informazioni fornite, insieme con quelle precisate per uno o più preparati contenenti il microrganismo, devono essere sufficienti per consentire una valutazione dell'impatto sulle specie non bersaglio (flora e fauna) che potrebbero essere soggette a rischi da esposizione al microrganismo, se di rilevanza ambientale.

L'impatto può risultare da un'esposizione singola, prolungata o ripetuta e può essere reversibile o irreversibile.

- xiii) Le informazioni fornite relative al microrganismo, insieme con altre informazioni pertinenti e con quelle fornite per uno o più preparati che lo contengono, dovrebbero essere sufficienti per:

- poter decidere se il microrganismo possa essere incluso o meno nell'allegato I,
- specificare le opportune condizioni o limitazioni cui assoggettare l'eventuale inclusione nell'allegato I,
- permettere una valutazione dei rischi a breve e lungo termine per le specie non bersaglio – popolazioni, comunità e processi – secondo i casi,
- classificare il microrganismo secondo il danno biologico,
- specificare le precauzioni occorrenti per la protezione delle specie non bersaglio, e
- specificare i simboli di rischio, le indicazioni di pericolo e le frasi pertinenti relative al rischio e alla sicurezza per la protezione dell'ambiente da indicare sull'imballaggio (contenitori).

- xiv) È necessario che tutti gli effetti potenzialmente dannosi scoperti durante le regolari indagini ecologiche siano riportati nella relazione e che, se richiesto dalle autorità competenti, vengano intrapresi e documentati studi supplementari che si rendessero necessari allo scopo di studiare i probabili meccanismi implicati e di valutare l'importanza di questi effetti. La relazione deve riportare tutti i dati e tutte le informazioni di ordine biologico disponibili e utili per la valutazione del profilo ecologico del microrganismo.
- xv) In tutti gli studi deve essere indicata la dose media realizzata, espressa in cfu/kg di peso corporeo e in altre unità adeguate.
- xvi) Può essere necessario effettuare studi separati per i metaboliti rilevanti (specialmente tossine), qualora questi prodotti possano rappresentare un rischio rilevante per organismi non bersaglio e i loro effetti non siano valutabili in base ai risultati relativi al microrganismo. Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competente circa la necessità di eseguirli e, secondariamente, circa il tipo di studio da eseguire. Si prenderanno in considerazione le informazioni risultanti dalle sezioni 5, 6 e 7.
- xvii) Allo scopo di facilitare la valutazione della significatività dei risultati ottenuti, nelle varie prove specificate si dovrà utilizzare, se possibile, lo stesso ceppo di ciascuna specie pertinente (o specie della stessa origine registrata).
- xviii) Non occorre eseguire le prove se si può dimostrare che l'organismo non bersaglio non sarà esposto al microrganismo. Se viene dimostrato che il microrganismo non ha effetti tossici e non è patogeno né infettivo per i vegetali o per i vertebrati, si dovrà esaminare soltanto la reazione ad opportuni organismi non bersaglio.

## 8.1. **Effetti sugli uccelli**

### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli uccelli.

## 8.2. **Effetti sugli organismi acquatici**

### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli organismi acquatici.

### 8.2.1. Effetti sui pesci

#### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per i pesci.

### 8.2.2. Effetti sugli invertebrati di acqua dolce

#### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli invertebrati di acqua dolce.

#### 8.2.3. Effetti sulla crescita delle alghe

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla crescita delle alghe, sul tasso di accrescimento e sulla capacità di recupero.

#### 8.2.4. Effetti sui vegetali diversi dalle alghe

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni circa gli effetti sui vegetali diversi dalle alghe.

#### 8.3. **Effetti sulle api**

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per le api.

#### 8.4. **Effetti su artropodi diversi dalle api**

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per gli artropodi diversi dalle api. La scelta delle specie da esaminare sarà determinata dall'uso potenziale del prodotto fitosanitario (per esempio, applicazione sulle foglie o al suolo). Particolare attenzione deve essere rivolta agli organismi utilizzati per la lotta biologica e agli organismi che svolgono un ruolo importante nella difesa integrata contro i parassiti.

#### 8.5. **Effetti sui lombrichi**

##### Scopo della prova

Devono essere presentate informazioni sulla tossicità, l'infettività e la patogenicità per i lombrichi.

#### 8.6. **Effetti su microrganismi non bersagli del terreno**

Deve essere documentato l'impatto su microrganismi non bersaglio rilevanti e sui loro predatori (per esempio protozoi per inoculazione batterica). Per decidere se siano necessari studi supplementari, bisognerà ricorrere al parere di esperti. Ai fini di tale decisione, entreranno in considerazione le informazioni disponibili a titolo della presente e di altre sezioni, in particolare i dati sulla specificità del microrganismo e sull'esposizione prevista.

Utile informazioni potranno essere ricavate anche dalle osservazioni condotte nell'ambito delle prove di efficacia. Particolare attenzione sarà rivolta agli organismi utilizzati nella difesa integrata delle colture.

#### 8.7. **Studi supplementari**

Ulteriori studi potrebbero vertere sugli effetti acuti esaminati su altre specie o in altri processi (ad esempio i sistemi fognanti), oppure su fasi superiori come quella cronica, subletale o riproduttiva in organismi non bersaglio selezionati.

Prima di eseguire tali studi, il richiedente deve ottenere l'accordo delle autorità competenti circa il tipo di studio da eseguire.

## 9. **SINTESI E VALUTAZIONE DELL'IMPATTO AMBIENTALE**

Si dovrà eseguire una sintesi e una valutazione di tutti i dati relativi all'impatto sull'ambiente, secondo le direttive impartite dalle autorità competenti degli Stati membri per quanto riguarda il formato di tali sintesi e valutazioni. Vi dovrà figurare una valutazione particolareggiata e critica di tali dati, tenendo conto dei pertinenti criteri e orientamenti valutativi e decisionali, con particolare riferimento ai rischi, reali o eventuali, per l'uomo e per gli animali, unitamente ad indicazioni sulla portata, la qualità e l'affidabilità della base di dati. In particolare, si dovranno considerare i seguenti aspetti:

- distribuzione e destino nell'ambiente e relativi tempi,
- identificazione di specie e popolazioni non bersaglio a rischio e portata della loro esposizione potenziale,
- definizione delle precauzioni necessarie per evitare o minimizzare la contaminazione dell'ambiente e per proteggere le specie non bersaglio.