

**AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE
DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS**

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

Testes Toxicopatológicos em Mamíferos

VOLUME II

*Vera L.S.S. Castro, Deise M.F. Capalbo, Gilberto J. de Moraes,
Elizabeth A.B. De Nardo e Mário Cesar B. De Oliveira*

Embrapa

Meio Ambiente

PROTOCOLO

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Embrapa Meio Ambiente

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

PROTOCOLO

AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

Testes Toxicopatológicos em Mamíferos

VOLUME II

Vera L.S.S. Castro, Deise M.F. Capalbo, Gilberto J. de Moraes,
Elizabeth A.B. De Nardo e Mário C.B. de Oliveira

Jaguariúna, SP
1999

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – Documentos 10.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP-340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (19) 867-8700 Fax: (19) 867-8740

e-mail:sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações: Aldemir Chaim, Célia M. M. de S. Silva, Franco Lucchini, Julio F. de Queiroz, Magda A. de Lima e Maria Cristina Tordin

Revisão: Denise Moraes de Oliveira.

Normalização: Maria Amélia de Toledo Leme

Produção Gráfica: Regina L.Siewert Rodrigues e Franco Ferreira de Moraes

Tiragem: 500 exemplares

CASTRO, V.L.S.S.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, G. J.; DE NARDO, E. A. B.; OLIVEIRA, M. C. B.; **Protocolo avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. II. Testes Toxicopatológicos em Mamíferos.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 40p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 10).

CDD. 632.96

©EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 1999

PROTOCOLO
**AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE
DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS¹**

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

Testes Toxicopatológicos em Mamíferos

VOLUME II

Vera L.S.S. Castro², Deise M.F. Capalbo³, Gilberto J. de Moraes⁴,
Elizabeth A.B. De Nardo⁵ e Mário C.B. de Oliveira⁶

¹ Documento elaborado e financiado através dos projetos 11.0.94.225 (Embrapa) e 620556/94-3 (CIAMB-PADCT/CNPq)

² Veterinária, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente. Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP.

³ Engenheira de Alimentos, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

⁴ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., ESALQ-USP/Depto. de Zoologia, CEP 13.418-900, Piracicaba, SP.

⁵ Bióloga, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente

⁶ Engenheiro Agrônomo, IBAMA/Diretoria de Controle Ambiental - SAIN, Via L4 Norte, ED. Sede, Bloco C, CEP 70.800-200, BRASILIA, DF.

SUMÁRIO

Apresentação.....	07
Introdução	09
1. Informações Gerais	
1.1. Diretrizes e Objetivos dos testes.....	10
1.2. Outros Aspectos relevantes.....	12
1.3. Comentários Gerais.....	12
1.4. Elaboração de relatórios.....	13
1.5. Conteúdo do relatório final.....	13
2. Testes	
2.1.a. Procedimentos gerais para os testes por via oral, pulmonar, dermal e intravenosa	15
2.1.b. Patogenicidade/toxicidade oral aguda	18
2.1.c. Patogenicidade/toxicidade dermal aguda	19
2.1.d. Patogenicidade/toxicidade pulmonar aguda.....	20
2.1.e. Patogenicidade/toxicidade intravenosa aguda.....	20
2.1.f. Irritação ocular primária	21
2.1.g. Relato de hipersensibilidade	24
2.1.h. Cultura de Células (para vírus como agente de controle)	24
2.2.a. Toxicidade Aguda	29
2.2.b. Patogenicidade/Toxicidade Subcrônica	30

2. Testes

2.3.a. Efeitos sobre reprodução e fertilidade.....	33
2.3.b. Efeitos Oncogênicos	36
2.3.c. Indução de imunodeficiência.....	36
2.3.d. Infectividade/patogenicidade a primatas.....	36
Referência Bibliográficas	38
Agradecimentos.....	40

APRESENTAÇÃO

O Brasil é um país eminentemente agrícola. Esta afirmativa vem sendo feita há muitos anos, e ainda hoje é válida, apesar do significativo desenvolvimento nacional em outras atividades, especialmente no que se refere à industrialização. A importância da agricultura para o Brasil talvez se mantenha em altos níveis ainda por muito tempo, tendo em vista as características do país ou seja, um vasto território constituído por áreas agricultáveis que podem suprir as necessidades nacionais e ainda permitir a produção de um quântia extra que permita a arrecadação de divisas com a exportação.

Entretanto, para muitos a produção agrícola implica o uso de produtos químicos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, o que muitas vezes pode conduzir à poluição ambiental, reduzindo a qualidade de vida da população que vive próxima às áreas agrícolas e daqueles que consomem os alimentos ali produzidos. Um dos maiores desafios da agricultura moderna é permitir o aumento da produção agrícola sem o comprometimento da qualidade dos alimentos, de outros produtos agrícolas e da água, e sem reduzir a diversidade local de plantas, animais e microrganismos.

Um dos empreendimentos mais promissores neste sentido se refere à busca de alternativas às formas convencionais de controle de pragas, através do uso de produtos de ocorrência natural, elaborados com microrganismos patogênicos aos organismos indesejáveis, encontrados em áreas agrícolas. Eles são mais comumente fungos, bactérias e vírus e têm se mostrado seguros em relação a seus possíveis efeitos sobre o homem e outros organismos não-visados do ambiente. Seu uso pode resultar no controle satisfatório de organismos indesejáveis, sem que o ambiente seja afetado desfavoravelmente. Entretanto, não se deve esperar que apenas por serem de ocorrência natural, estes produtos sejam sempre totalmente inócuos a organismos não-alvo.

É sempre possível que um determinado microrganismo eficiente no controle de uma praga possa também afetar outros componentes biológicos do ecossistema. Como forma de defesa do ambiente e dos consumidores, compete aos órgãos públicos controlar o uso desses produtos, requerendo sua avaliação adequada previamente ao seu registro para uso comercial. Compete ainda, aos mesmos, estabelecer os critérios para a avaliação dos produtos, dentro de normas específicas compatíveis com os padrões internacionais que regulamentam o mesmo assunto. Essas normas devem levar em consideração as diferenças fundamentais entre produtos químicos e biológicos, no que se refere à composição, à forma de ação e ao comportamento no ambiente.

Com o objetivo de estabelecer os critérios de avaliação da segurança dos produtos biológicos, o Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (Embrapa Meio

Ambiente) iniciou uma parceria com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Diretoria de Controle e Fiscalização, no final de 1994, através do projeto de pesquisa "Análise de Risco e Impacto Ambiental do Uso de Agentes de Controle Biológico". Um dos principais objetivos daquele projeto foi o de resgatar os esforços anteriores de diferentes instituições nacionais, retomar suas colaborações e, em conjunto, concretizar uma proposta de avaliação de produtos biológicos para fins de registro junto aos órgãos federais competentes.

Como primeiro resultado deste esforço foi publicado em 1995 o documento "Requisitos para a análise de risco de produtos contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos – Uma proposta para os órgãos federais registrantes". Esse documento sugeriu detalhadamente as informações a serem exigidas pelos órgãos registrantes, de forma a permitir uma avaliação de sua segurança de uso. Também foi utilizado pelo Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE) através do Grupo de Trabalho Permanente em Controle Biológico (GTP-CB), como modelo para harmonização da Regulamentação para Registro de Produtos Microbianos de Controle de Pragas entre os países do Cone Sul: Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, tendo sido este último implementado na região em janeiro de 1998.

O documento proposto foi adequado na forma de uma portaria publicada recentemente pelo IBAMA (Portaria 131, de 3 de Novembro de 1997), estabelecendo os critérios e procedimentos a serem adotados junto àquele Instituto para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária.

No momento, se faz necessário o estabelecimento de protocolos que sugiram de forma detalhada meios de se obter os dados requeridos na citada portaria.

Os protocolos foram elaborados com o objetivo de viabilizar o registro dos produtos contendo agentes microbianos de controle de pragas no Brasil e são compostos por quatro volumes, cada um correspondendo a uma avaliação específica, como segue:

- Informações sobre o produto e análise de resíduos
- Testes toxicopatológicos em mamíferos
- Testes toxicopatológicos em organismos aquáticos
- Testes toxicopatológicos em organismos não-alvos do ambiente terrestre

Espera-se que este documento seja adotado pelos órgãos federais registrantes, de maneira que seja promovido o interesse por esta forma alternativa de controle de organismos nocivos, reduzindo os impactos ambientais indesejáveis e melhorando a qualidade de vida dos agricultores e consumidores.

Gilberto de Moraes - ESALQ/USP

Elizabeth A.B. De Nardo - Embrapa Meio Ambiente

INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos, seus produtos ou seus metabólitos para o controle de organismos indesejáveis na agricultura tem se tornado cada vez mais comum em diversos países. Esses produtos, na forma pura ou formulada, são normalmente conhecidos como AMC's.

A concessão de registro de AMC's pelos órgãos federais registrantes no Brasil está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos a seres humanos ou ao ambiente. Os documentos básicos relativos a esse assunto são a Lei nº 7.802 de 11/07/89, o Decreto nº98.816 de 11/01/90 e a Portaria 131 de 03/11/97, específica para o registro dos AMC's.

Na elaboração deste documento foram consultados similares elaborados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América, pela Comunidade Econômica Européia (CEE) e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). De forma particular, deve-se destacar o documento da EPA denominado "Subdivision M", que serviu como base na elaboração deste Protocolo.

O Protocolo se aplica a todos os microrganismos de ocorrência natural e àqueles que são estirpes obtidas através de seleção por métodos convencionais. O registro de microrganismos geneticamente modificados por processos biotecnológicos pode requerer testes adicionais aos estabelecidos neste Protocolo, de acordo com a avaliação caso-a-caso feita pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança do Ministério de Ciência e Tecnologia – CTNBio (Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995 regulamentado pela Lei nº 8.974 de 5 de janeiro de 1995).

1- INFORMAÇÕES GERAIS

1.1. Diretrizes e objetivos dos testes

Este Protocolo estabelece diretrizes para a condução de testes em mamíferos, com o objetivo de avaliar o potencial de efeitos indesejáveis, causados por agentes microbianos de controle (AMC´s). Esses testes são conduzidos em uma seqüência de três Fases, considerando os seguintes aspectos:

1. Patogenicidade do AMC e de contaminantes microbianos;
2. Infectividade/persistência do AMC e de contaminantes microbianos;
3. Toxicidade do AMC, contaminantes microbianos e subprodutos de fabricação.

Todos os testes tratados neste Protocolo deverão ser realizados seguindo-se os princípios de boas práticas de laboratório, de acordo com o documento INMETRO-CTLE 06 (1995) elaborado pelo Instituto Brasileiro de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

Fase I:

O propósito dos estudos desta Fase é realizar uma avaliação tóxicopatológica do AMC no que diz respeito à patogenicidade, infectividade e toxicidade.

As avaliações toxicopatológicas conduzidas serão as seguintes:

- Oral aguda;
- Pulmonar aguda;
- Intravenosa aguda;
- Cultura de tecidos (específicas para vírus).

Outros estudos são considerados apropriados para avaliar a toxicidade de componentes químicos de uma preparação de AMC, devendo ser realizados com a formulação completa de AMC:

- Toxicidade dermal aguda;
- Irritação ocular primária;
- Relatos de hipersensibilidades ocasionais.

Fase II:

Os estudos dessa Fase somente serão desenvolvidos quando os testes da Fase I indicarem que o AMC mostrou infectividade ou toxicidade sem qualquer evidência de patogenicidade. Se forem observados efeitos tóxicos nos estudos da Fase I, na ausência de sinais de infectividade ou patogenicidade, então um estudo de toxicidade aguda na Fase II é normalmente exigido com os componentes tóxicos da preparação de

AMC. A seguir, encontram-se as definições de infectividade, persistência e toxicidade:

1. Infectividade/Persistência prolongada: quando o AMC é capaz de infectar animais-teste sem demonstrar sinais definitivos de patogenicidade ou toxicidade, ou quando o AMC puder persistir em animais-teste por períodos mais longos do que normalmente esperado, deverão ser conduzidos testes subcrônicos visando a determinar se exposições repetidas ao AMC podem causar efeitos tóxicos ou patológicos. Outros estudos da Fase II também podem ser requeridos nos seguintes casos: se não for possível obter uma determinada preparação de AMC isenta de contaminantes microbianos; se os contaminantes microbianos não são suficientemente caracterizados; ou se existir razão suficiente para se acreditar que toxinas produzidas por microrganismos existam na preparação, mas não afetam os animais-teste nas avaliações da Fase I.

Deve ser dada atenção especial para alguns estágios de microrganismos (por exemplo, alguns esporos) que podem ser eliminados do animal-teste mais vagarosamente que estágios vegetativos do mesmo microrganismo. Além disso, há a possibilidade de que certos AMC's possam ser isolados dos animais-testes na Fase I, mesmo ao final dos períodos de observação recomendados. A presença de AMC's no final do experimento não deve automaticamente conduzir à necessidade de execução de testes da Fase II. Os dados devem ser interpretados considerando as curvas de declínio dos microrganismos (clearance) obtidas e à luz de qualquer evidência que o AMC se multiplique no animal-teste.

2. Toxicidade: a toxicidade de uma preparação de AMC a animais-teste pode ser causada por substâncias produzidas pelo AMC, por microrganismos contaminantes de suas formulações ou substâncias que são constituintes destas formulações. Os estudos da Fase I se destinam a detectar efeitos tóxicos agudos de componentes biológicos ou não-biológicos de uma preparação de AMC, na ausência de sinais de patogenicidade ou infectividade. Os estudos de toxicidade dermal aguda se destinam primariamente a avaliar os efeitos tóxicos devido a componentes químicos do AMC ou de componentes não-biológicos da preparação de AMC, pois espera-se que apenas raramente um microrganismo possa atravessar a barreira da pele ou infectar células epiteliais de um animal saudável, simplesmente por ser colocado em contato com a pele. Um estudo de toxicidade/patogenicidade aguda intravenosa é previsto na Fase I para avaliar possíveis efeitos adversos de uma preparação de AMC, quando a barreira representada pela pele é atravessada propositadamente.

Estudos adicionais para a avaliação dos efeitos de toxicidade das preparações de AMC nas Fases II ou III deverão acompanhar o protocolo adotado pelo IBAMA para estudos de toxicidade de pesticidas químicos (BRASIL, 1988).

Fase III:

Em geral, se for determinado na Fase I que o AMC é patogênico para os animais-teste, o órgão registrante deve ser consultado para determinar a próxima ação a ser tomada. Os AMC's que são potencialmente patógenos de mamíferos não têm sido considerados como candidatos para registro como pesticidas. Entretanto, não é de todo descartável que patógenos desta natureza possam ser considerados para o desenvolvimento de AMC's como, por exemplo, rodenticidas. Em tais casos, devem ser realizadas considerações cuidadosas e avaliações extensivas dos efeitos patogênicos do AMC a mamíferos não-visados.

Os testes propostos para esta Fase são:

- Efeito sobre Reprodução e Fertilidade
- Estudos de Oncogenicidade
- Estudos de Imunodeficiência
- Estudos de Patogenicidade/Infectividade em Primatas

Os vírus e protozoários usados como AMC´s requerem atenção especial pelas seguintes razões:

1. Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e protozoários podem ser parasitas intracelulares obrigatórios ou facultativos;
2. Esses parasitas podem ser de difícil identificação taxonômica;
3. Preparações desses AMC´s isentas de organismos contaminantes ou de material celular podem ser difíceis de se obter;
4. Eles podem estar presentes como contaminantes em preparações de outros AMC´s.

Os estudos da Fase III se destinam primariamente à avaliação do potencial de patogenicidade dos AMC´s, ou dos contaminantes microbianos de preparações dos mesmos, que são reconhecidamente parasitas de células de mamíferos, ou que se mostram parasitas intracelulares nos testes conduzidos nas Fases anteriores. Os testes da Fase III também podem ser apropriados para a avaliação de parasitas de mamíferos que tenham sido modificados geneticamente de forma a torná-los não-patogênicos.

1.2. Outros aspectos relevantes

- (1) Identificação e caracterização dos AMC´s: a caracterização taxonômica apropriada do AMC é requerida para uma avaliação inicial de possíveis efeitos adversos a mamíferos (incluindo seres humanos).
- (2) Alergia e hipersensibilidade: o relato de respostas alérgicas de seres humanos às preparações do AMC é tomado como suficiente para se considerar problemas de saúde a esses tipos de reações. Com base nas informações de tais relatos, o órgão registrante recomendará as precauções no manuseio de tal AMC. Quando o AMC se constituir em um alergênico comum, o órgão registrante poderá requerer a declaração de precauções apropriadas no rótulo do produto.
- (3) Irritação ou injúria ocular: se o requerente se dispuser a especificar no rótulo que os aplicadores do produto terão que utilizar proteção apropriada nos olhos, para evitar efeitos negativos, ele ficará isento da realização dos testes de irritação ocular primária.

1.3. Comentários Gerais

A grande maioria dos microrganismos usados atualmente como AMC´s é supostamente segura quanto a ocasionar prejuízos ambientais e à saúde humana. Os testes usados para a avaliação desses AMC´s são baseados na extrapolação de resultados interespecies e que pressupõem condições padronizadas de avaliação, além de similaridades anatomofisiológicas entre a espécie escolhida e o homem. Porém, os

efeitos adversos e/ou sintomas decorrentes da exposição aos microrganismos, passíveis de serem observados nesses testes, podem também depender de fatores relacionados ao microrganismo, como, por exemplo, a cepa utilizada nos estudos (George et al, 1993).

Entretanto, sob determinadas situações de estresse como subnutrição, antibioticoterapia, quimioterapia ou imunodeficiência pode ocorrer um aumento do risco de exposição de um indivíduo ou de uma população, acrescido ao fato de que nem sempre é possível estabelecer facilmente a dispersão do produto no ambiente.

1.4. Elaboração de relatórios

A elaboração dos relatórios deverá seguir os Princípios das Boas Práticas de Laboratório, de acordo com a terminologia de documento emitido pelo INMETRO- CTLE06 (1995).

Cada teste descrito deverá satisfazer os requisitos listados a seguir (a menos que algum protocolo específico aconselhe outra apresentação).

Exigências Gerais

- Deve ser redigido um relatório final do estudo.
- Recomenda-se o uso do Sistema Internacional de Medidas.
- O relatório final deve ser assinado e datado pelo Diretor do estudo, pelo responsável do teste, bem como os relatórios de outras áreas, anexados ao relatório final, devem ser datados e assinados pelo pesquisador principal responsável pela área.
- Correções e aditamentos ao relatório final devem ser feitos em forma de adendo. O anexo deve especificar claramente o motivo da correção ou do aditamento e deve ser assinado e datado pelo Diretor do estudo e pelo pesquisador principal de cada área envolvida.

1.5. Conteúdo do Relatório Final

O relatório final deve incluir as informações abaixo listadas (contudo, outras informações relevantes também poderão ser descritas):

- Identificação do estudo, do sistema-teste, da substância de referência e da substância de controle;
- Um título descritivo;
- Identificação da substância-teste por código ou nome (nomenclatura internacional);
- Identificação da substância de referência por código ou nome (nomenclatura internacional);
- Identificação da substância de controle por código ou nome (nomenclatura internacional);
- Caracterização da substância-teste, incluindo pureza, estabilidade e homogeneidade;
- Identificação e caracterização do sistema-teste.

Informações sobre a Unidade Operacional

- Nome e endereço;

- Nome do Diretor do estudo;
- Nome de outras pessoas envolvidas significativamente no relatório final.

Datas

- Datas nas quais os estudos foram iniciados e finalizados;
- Uma declaração da Unidade de Garantia da Qualidade certificando em que datas foram realizadas inspeções e em que datas os resultados auditoriais foram relatados ao Gerente e ao Diretor do estudo.

Materiais e métodos

- Descrição dos materiais e métodos utilizados;
- Referência aos procedimentos oficiais ou oficialmente reconhecidos.

Resultados

- Sumário dos resultados - os resultados a serem reportados especificamente em cada Fase estão descritos junto à metodologia correspondente;
- Todas as informações e dados constando do protocolo de estudo;
- Apresentação dos resultados incluindo cálculos e, quando pertinente, métodos estatísticos;
- Avaliação e discussão dos resultados e, quando apropriado, conclusões.

Arquivos e Armazenamento

- Local onde todos os espécimes, dados brutos e relatório final estão arquivados ou armazenados.

2- TESTES

2.1. Fase I

2.1.a. Procedimentos gerais para os testes por via oral, pulmonar, dermal e intravenosa

Substância a ser testada

Devem ser testados o produto técnico (PT) e o produto formulado (PF) como também o PT inativado. É aconselhável que o órgão federal seja consultado antes da realização dos testes, no sentido de determinar a forma/pureza de cada agente microbiano de controle (AMC) e de cada PF. Poderão ser conduzidos testes apenas com o PT ou com o PF, se eles forem idênticos. É sabido que certas formas do AMC podem ser mais apropriadas para certos testes. Em geral, a forma de um microrganismo a ser testado (ex: célula vegetativa, esporo, cisto, vírion) deverá ser equivalente àquela presente no produto a ser registrado. O microrganismo-teste também deverá ser equivalente àquele que se pretende registrar com respeito a estágio de crescimento, posse de organelas e apêndices e expressão de traços fenotípicos (incluindo produtos de genes que tenham sido intencionalmente introduzidos no microrganismo). Também deverão ser testadas as formas do microrganismo nas quais possa ocorrer alguma exposição significativa ou naquelas em que ocorrerem mudanças na forma anterior do microrganismo, ou ainda se puderem ocorrer alterações em espécies visadas ou não-visadas.

O lote das substâncias testadas deverá ser o mesmo durante todo o estudo e as amostras-teste deverão ser guardadas sob condições que mantenham a pureza e a estabilidade das mesmas. Se a estabilidade da substância-teste não puder ser mantida durante os estudos ou se, por outras razões, não for possível usar o mesmo lote durante o teste, lotes subseqüentes da substância-teste deverão ser selecionados para que sejam tão idênticos quanto possível ao lote original.

Animais-teste a serem utilizados

1. Espécie e linhagem: embora várias espécies de mamíferos possam ser empregadas, devem ser preferidas linhagens de camundongos ou ratos comumente utilizadas em laboratório. Se outra espécie for utilizada, o requerente deve apresentar a justificativa para tal escolha. Todos os animais-teste devem estar livres de parasitas ou patógenos. As fêmeas devem ser nulíparas e não-prenhes;
2. Idade: utilizar adultos jovens, com variação de peso não superior a 20% do peso médio de cada sexo;
3. Sexo: utilizar o mesmo número de animais para cada sexo;
4. Números: deve ser utilizado um número suficiente de animais (pelo menos três animais de cada sexo, em cada grupo testado) para permitir o sacrifício e a submissão deles à análise de possíveis efeitos prejudiciais a cada dia de observação, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de observação e sacrifício dos animais dos diversos grupos testados.

Dias de observação e sacrifício	0	3	7	14
Grupos	Número de machos ou fêmeas sac			
Testemunha	3	3	3	3
Produto técnico	3	3	3	3
Produto comercial	3	3	3	3
Prateleira	3	3	3	3
Produto técnico inativo	3	3	3	3

Grupos-testemunha e Prateleira

1. São exigidos um grupo-testemunha e um prateleira de animais não-tratados na condução do teste. Metade dos animais de ambos os sexos deve ser mantida separadamente do grupo exposto ao produto técnico ativo ou inativo e ao comercial (controle), enquanto o restante deverá ser mantido junto aos mesmos (prateleira);
2. Um grupo-testemunha para o veículo do AMC é requerido apenas quando a toxicidade do veículo for desconhecida;
3. Grupos-testemunha tratados com AMC´s inativados (produto técnico inativado) são utilizados para se avaliar as propriedades tóxicas. A inativação deve ser feita por um meio que permita a manutenção razoável da integridade estrutural do AMC.

Sacrifício de animais

Para a avaliação de infectividade e taxa de eliminação, o AMC deve ser detectado em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos de três animais tratados por sexo, de todos os grupos, sacrificados três dias após a administração do AMC e semanalmente a partir de então; ou dependendo do AMC testado, outro intervalo apropriado para que o número desses eventos seja suficiente para se estabelecer de forma adequada o padrão de eliminação. Dependendo do comportamento, presença ou ausência do AMC nos tecidos e/ou fezes, podem ser incluídos outros intervalos de sacrifício como o dia 1 no caso do microrganismo ser eliminado rapidamente.

Avaliações dos animais testados

Um exame clínico cuidadoso de todos os animais deve ser feito pelo menos uma vez ao dia. Os animais devem ser pesados no início e no término do experimento e semanalmente durante o teste. Outras observações a serem realizadas incluem:

1. Pele (incluindo sinais de irritação) e pêlo;
2. Olhos e mucosas;
3. Sistema respiratório;
4. Sistema circulatório;
5. Sistema nervoso periférico e central;
6. Atividade somatomotora;
7. Comportamento (atenção especial deve ser dada à ocorrência de tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação, sono e coma).

O momento da morte de cada animal deve ser anotado com a maior precisão possível. Os animais que morrerem durante o teste devem ser necropsiados.

Necropsia e Quantificação do Agente

Os animais devem ser sacrificados com éter ou CO₂. Deve-se observar o aspecto geral dos animais antes da necrópsia. Devem ser anotadas quaisquer alterações nos tratos gastrointestinal e urogenital, coração, pulmões, baço, fígado, rins, cérebro e qualquer lesão deve ser removida para posterior avaliação por técnica histopatológica ou outra que seja adequada. A presença do agente deve ser quantificada nesses órgãos e tratos. A avaliação da eliminação do AMC nas fezes (*clearance*) deve ser realizada nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após a exposição (ou outro intervalo apropriado dependendo do caso), principalmente após a exposição por via oral. Os tecidos e/ou fluidos removidos assepticamente e as fezes coletadas diretamente do intestino reto do animal devem ser colocados em tubos estéreis com 3,0ml de água peptonada (0,1%), pesados e homogeneizados para proceder à quantificação do agente. Após a administração intravenosa, seguindo-se os intervalos propostos durante o teste, é imprescindível a quantificação do agente no sangue. A sensibilidade do método de detecção do agente deve ser determinada e expressa como porcentagem de recuperação, além de observado o limite de detecção.

Relatório

Além das informações especificadas em "Elaboração de Relatórios (item 1.3 deste documento), os seguintes dados devem ser reportados:

1. Número de animais no início do teste;
2. Momento da morte de cada animal;
3. Número de animais mostrando sintomas de toxicidade ou patogenicidade;
4. Descrição de efeitos tóxicos e patogênicos;
5. Unidade do AMC utilizada e número destas unidades administrado por animal;
6. Peso corpóreo dos animais e idade;
7. Resultado das necrópsias;
8. Patologia/persistência encontrada;
9. Taxa de eliminação do AMC;
10. Descrição de todos os métodos de detecção e quantificação do AMC;
11. Verificação para comprovar se cada método de detecção é suficientemente sensível para a avaliação do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos.

Deve-se incluir uma avaliação da relação entre a exposição à substância testada e a incidência e severidade de todas as anomalias, incluindo anomalias comportamentais, anomalias clínicas, lesões, alterações de peso corpóreo, mortalidade, intoxicações, infectividade e patogenicidade.

Progressão das Fases

1. Se forem observados sinais significativos ou persistentes de patogenicidade, os testes de toxicidade oral aguda ou de patogenicidade podem ser exigidos em animais não-roedores;
2. Caso se suspeite da produção de toxinas pelo AMC ou se a produção de toxina for indicada por sinais significativos ou persistentes de toxicidade nos animais testados e na ausência de sinais de infectividade ou patogenicidade, então:
 - I. O(s) componente(s) tóxico(s) do material administrado deve(m) ser identificado(s) e, na medida do possível, isolado(s);
 - II. Um estudo de toxicidade aguda deve ser conduzido com o(s) componente(s) tóxico(s);
3. Caso seja observada infectividade significativa ou persistência anormal do AMC na ausência de sinais de toxicidade ou patogenicidade, então um estudo subcrônico (90 dias) deve ser realizado.

2.1.b. Patogenicidade/toxicidade oral aguda

Objetivo

Na avaliação de características tóxicas e patogênicas de um AMC, a determinação da patogenicidade/toxicidade oral aguda é normalmente o primeiro passo a ser tomado. Essa determinação fornece informações de riscos prováveis à saúde a partir de uma única exposição pela via oral. O objetivo deste estudo é fornecer informações iniciais sobre toxicidade, infectividade e patogenicidade de um AMC, utilizando-se uma única dose elevada do produto e observando-se os organismos tratados.

Características da dosagem do AMC

1. Dose: uma única dose de pelo menos 10^8 unidades do AMC por animal tratado deve ser utilizada. Se menor, o requerente deve justificar a razão para tal;
2. Quantificação da dosagem: técnicas utilizadas para quantificar as unidades de AMC em uma dose dependerão do grupo de microrganismo ao qual o AMC pertence. Quando possível, deve-se determinar a quantidade de unidades viáveis, potencialmente viáveis ou infectivas em cada dose.
3. Veículo: o veículo recomendado para PT é qualquer um que permita a manutenção da viabilidade, a capacidade de germinação, a capacidade de evolução do cisto ou, para parasitas intracelulares, a capacidade de infecção no hospedeiro;
4. Volume: o máximo volume de líquido que pode ser administrado de uma só vez depende do tamanho do animal testado. Em roedores, o volume não deve exceder 2ml/100g de peso corpóreo. A variabilidade do volume testado deve ser minimizada.

Administração

1. Os animais devem ser mantidos em jejum durante a noite anterior à administração da substância e após ela deve ocorrer um jejum de mais 3 ou 4 horas;

2. O AMC deve ser administrado oralmente por gavagem em uma única vez;
3. Se não for possível a administração de uma única dose, esta pode ser dada em porções menores durante um período não superior a 24h. Nesse caso, pode ser necessário oferecer alimento e água aos animais durante o período, dependendo de sua duração.

2.1.c. Patogenicidade/toxicidade dermal aguda

Objetivo

Esse teste fornece informações sobre a probabilidade de haver danos conseqüentes de uma única aplicação dermal de químicos, na forma sólida ou solúvel, presentes na preparação do AMC, e/ou associados a outros ingredientes em formulações de AMC, e/ou associados a produtos de material genético intencionalmente introduzido no AMC.

Características da dosagem do AMC

1. Dose: a substância-teste deve ser aplicada à razão de 2g/animal-teste. Se uma dose menor for utilizada, o requerente deverá justificá-la;
2. Veículo: quando necessário, a formulação a ser testada deve ser suspensa em um veículo, de preferência em uma solução aquosa. O veículo recomendado para o PF usualmente é o mesmo material no qual o AMC será misturado, suspenso ou diluído para aplicação no campo;
3. Volume: o conteúdo de umidade do material-teste não deve ser excessivo, mas apenas suficiente para evitar sua secagem significativa durante o período de exposição e para assegurar um bom contato com a pele.

Preparação da pele do animal

Aproximadamente 24 horas antes do teste, o pêlo deve ser removido da porção dorsal e ventral do corpo do animal, através de tosquia ou raspagem.

Pelo menos 10% da superfície do corpo deve ser preparada para receber a aplicação da substância. O peso do animal deve ser considerado ao se decidir a área a ser preparada.

Administração

1. A substância-teste deve ser aplicada uniformemente sobre uma área correspondente a aproximadamente 10% da superfície total do corpo do animal;
2. A substância-teste deve ser mantida em contato com a pele com uma gaze e uma fita adesiva não irritante durante as 24 horas de exposição. O local de exposição deve ser coberto de forma a evitar que o animal ingira a substância-teste. Podem ser utilizados restritores evitando-se, entretanto, a imobilização total do animal;
3. No final do período de exposição, a substância-teste residual deve ser removida com água.

Ao final do período de exposição, e diariamente a partir de então, devem ser anotados quaisquer sinais de irritação da pele, indicando a extensão e a intensidade desses. Quanto ao relatório,

nesse teste são dispensáveis as informações referentes à taxa de eliminação do agente e ao método de detecção, uma vez que assume-se que ele não penetraria na pele íntegra. Entretanto, é necessário informar o peso seco do material-teste aplicado por kg de peso corpóreo de cada animal.

2.1.d. Patogenicidade/toxicidade pulmonar aguda

Objetivo

Este teste é necessário para o registro do PF, fornecendo informações sobre possíveis riscos de uma única exposição via pulmonar, no que se refere à toxicidade, infectividade e patogenicidade de um AMC aplicado em uma única dose alta.

Características da dosagem do AMC

1. Dose: uma dose de pelo menos 10^8 unidades de AMC por animal-teste deve ser utilizada. Caso ela seja menor, o requerente deve justificar a razão para tal;
2. Volume: o máximo volume de líquido que pode ser administrado via intranasal ou intratraqueal de uma só vez depende do tamanho do animal-teste. Em roedores, o volume usualmente não deve exceder 0,3ml/100g de peso corpóreo. A variação do volume utilizado deve ser a menor possível.

Administração

A substância-teste deve ser administrada através de um sistema apropriado em uma única dose, de cada animal-teste na dependência do diâmetro médio aerodinâmico das partículas, que pode ser suficiente para se preferir a exposição intratraqueal (através de um laringoscópio) ou a instilação intranasal (através de cânula apropriada).

2.1.e. Patogenicidade/toxicidade intravenosa aguda

Objetivo

Esse teste é exigido para o registro de PT e PF. Os dados obtidos nele fornecem informações sobre possíveis riscos de uma única exposição, sobrepondo-se artificialmente à barreira supostamente oferecida pela pele à entrada do AMC. O objetivo do teste é fornecer informações iniciais sobre a toxicidade, infectividade e patogenicidade de um AMC, usando-se uma dose alta do produto.

Características da dosagem do AMC

1. Dose: Uma dose de pelo menos 10^7 unidades de AMC por animal-teste deve ser utilizada. Se ela for menor, o requerente deve justificar a razão para tal;
2. Volume: O volume máximo de líquido que pode ser administrado via intravenosa, de uma só vez, depende do tamanho do animal-teste. A variação dos volumes utilizados no teste deve ser a menor possível.

Administração

A substância-teste deve ser administrada através de uma agulha e seringa em uma única dose. Se uma única dose não for possível, a substância poderá ser administrada em frações menores em um período máximo de 24 horas.

2.1.f. Irritação ocular primária

Objetivo

Esse teste é exigido para o registro do PF. Os dados obtidos nele fornecem informações sobre possíveis riscos de uma única exposição dos olhos ao AMC, aos ingredientes inertes de sua formulação e/ou a produtos de gens intencionalmente introduzidos no AMC.

Metodologia

Cada formulação do AMC, conforme descrito a seguir, é aplicada em um olho de cada animal experimental. O olho não-tratado serve como testemunha. O grau de irritação é observado avaliando-se sua extensão e intensidade a intervalos preestabelecidos.

Substância a ser testada

A formulação não precisa ser testada quando contiver substâncias de propriedades corrosivas e, por exemplo, produzir corrosão ou irritação severa no teste de patogenicidade/toxicidade dermal aguda. Tal fato deve constar do rótulo do produto para alertar os aplicadores na ocasião de sua utilização.

Animais a serem utilizados

Espécie e Linhagem: deve ser dada preferência ao uso de coelhos albinos.

Número e Idade: pelo menos 6 animais adultos devem ser utilizados, a menos que exista uma justificativa plausível para a utilização de um número menor de animais.

Grupos-testemunha

1. Não é exigida a manutenção de um grupo separado de animais-testemunha, uma vez que cada animal serve como seu próprio controle;
2. É exigido um grupo-testemunha para a substância veículo do AMC, quando houver indicação de que o veículo possa causar qualquer reação ocular tóxica ou se o efeito ocular do veículo for desconhecido.

Características da dosagem do AMC

1. Dose: uma dose de pelo menos 10^7 unidades de AMC por animal-teste deve ser utilizada para cada olho tratado. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal e o número de unidades de AMC no PF deve ser registrado por ocasião do teste;
2. Volume: um volume de 0,1 ml deve ser usado quando o produto a ser testado corresponde a uma suspensão pouco densa do AMC. Caso esse produto seja um sólido ou uma pasta fluída deve ser usado 0,1 g, a menos que haja uma justificativa aceitável para o uso de quantidade diferente.

Exame dos olhos antes do teste

Ambos os olhos de cada animal provisoriamente selecionado devem ser examinados durante as 24 horas que precedem o teste. Qualquer animal mostrando irritação ou infecção no olho, defeitos oculares ou sinais de injúrias na córnea não deve ser utilizado.

Administração

A substância-teste deve ser colocada no saco conjuntivo de um olho de cada animal, puxando-se para baixo a pálpebra inferior do olho a ser tratado. As pálpebras são então juntadas por cerca de um segundo para evitar a perda do material. Uma anestesia local para reduzir a dor pode ser utilizada antes da instilação da substância-teste, contanto que se apresentem evidências de que tal anestésico não influencia as reações da substância-teste. O olho-testemunha também deve ser anestesiado.

Os olhos dos animais tratados não devem ser lavados até 24 horas após a instilação; depois desse período, a água morna pode ser utilizada para lavar os olhos.

Observação dos Animais Tratados

A duração do período de observação não deve ser inflexível, mas suficiente para se assegurar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados. Normalmente, esse período não precisa ser maior que 21 dias após a instilação.

Exame clínico e julgamento dos resultados

Os olhos de todos os animais devem ser examinados para se verificar lesões 1, 24, 48 e 72 horas, e 4 e 7 dias após o tratamento. Caso se observe irritação até o dia 7, outros exames devem ser feitos a cada 3 dias a partir de então, por um período total de 21 dias. Se não houver evidência de irritação no sétimo dia após o tratamento, o estudo deve ser encerrado. Além das observações da córnea, íris e membrana conjuntiva, qualquer outro tipo de lesão deve ser relatado. A região periocular também deve ser examinada para se observar possíveis lesões. Devem se atribuir notas às lesões oculares de acordo com a Tabela 2 de lesões oculares proposta por Draize et al. (1965).

Tabela 2. - Graus de Lesões Oculares

Córnea	
(A) Opacidade: grau de intensidade (área mais densa usada para leitura)	
Sem ulceração ou opacidade:	0
Áreas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes da íris visíveis:	1
Áreas translúcidas facilmente perceptíveis, detalhes da íris levemente obscurecidos:	2
Áreas nacaradas, detalhes da íris invisíveis, tamanho da pupila pouco perceptível:	3
Córnea opaca, íris não perceptível devido à opacidade:	4
(B) Área afetada da córnea	
Nenhuma	0
0 a ¼	1
maior que ¼ e menor que 1/2	2
maior que 1/2 e menor que ¾	3
maior que ¾	4

Score = A X B X 5
Máximo total possível = 80

O exame de reações pode ser facilitado pelo uso de instrumentos óticos. Depois da observação realizada 24 horas após o tratamento, os olhos dos animais podem ser examinados com fluorescina.

Íris

Normal

Pregas profundamente marcadas, congestão, inchaço, hiperemia (quaisquer destas alterações ou combinações delas), íris com reação à luz, hemorragia, destruição total (qualquer uma ou todas)

Escore = A X 5

Máximo total possível = 10

Conjuntiva

(A) Avermelhamento (refere-se à conjuntiva palpebral e bulbar)

Vasos sangüíneos normais

Alguns vasos sangüíneos hiperêmicos

Coloração vermelho-difusa, vasos individuais não facilmente perceptíveis

Coloração vermelho-forte, difusa

(B) Quemose (Pálpebra e/ou membrana nictitante)

Sem inchaço

Inchaço acima do normal (incluindo membrana nictitante)

Inchaço evidente com eversão parcial das pálpebras

Inchaço com pálpebras semicerradas

Inchaço com pálpebras mais que semicerradas

(C) Secreção

sem secreção

qualquer quantidade diferente do normal

com umedecimento das pálpebras e dos pêlos adjacentes

com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes, mas com área cr

Escore = (A + B + C) X 2

Máximo total possível = 20

Total Máximo de Escores

O total máximo dos escores é a soma de todos os escores obtidos para córnea, íris e conjuntiva.

Relatório

Os dados devem ser apresentados em forma tabular, mostrando para cada animal:

1. O grau de irritação (de acordo com a Tabela 2) a cada observação;
2. A descrição do grau e da natureza da irritação;
3. A presença de lesões severas;
4. Quaisquer outros efeitos além dos oculares.

O grau de irritação do olho deve ser avaliado em conjunto com a natureza e irreversibilidade das respostas observadas. As notas individuais não representam a determinação absoluta das propriedades irritantes de um material. Elas devem ser vistas como valores de referência e apenas têm

significado quando acompanhadas de uma descrição adequada e de uma avaliação das observações.

Além das informações especificadas em “Elaboração de Relatórios” (item 1.3 deste documento), os seguintes dados devem ser relatados:

1. Descrição da natureza física da substância-teste;
2. Unidades do AMC na dose de cada formulação testada e o peso da substância-teste em cada dose;
3. Espécie e linhagem do animal testado;
4. Descrição narrativa do grau e natureza da irritação, corrosão, lesão ou infecção observada;
4. Descrição de qualquer efeito não-ocular observado;
5. Descrição do método utilizado para avaliar a irritação.

2.1.g. Relato de hipersensibilidade

Dados sobre a ocorrência de hipersensibilidade, incluindo reações imediatas e retardadas em seres humanos e animais domésticos, durante a produção ou teste do PT ou PF, devem ser relatados para subsidiar a solicitação de registro.

Relatório

Os requisitos para o relatório desses incidentes devem ser os mesmos que aqueles nos protocolos existentes para pesticidas químicos. Quando disponíveis, as seguintes informações devem ser fornecidas:

1. Uma descrição dos ingredientes (incluindo o AMC ao qual o indivíduo afetado foi exposto);
2. Frequência, via e duração da exposição ao material;
3. Data, horário e local geográfico da exposição ao material;
4. Situações ou circunstâncias sob as quais a exposição ocorreu;
5. Quaisquer observações clínicas.

Progressão da Fase

Se quaisquer incidentes de hipersensibilidade de seres humanos ou animais domésticos forem observados durante a produção ou realização dos testes, serão exigidos testes da Fase II. As exigências específicas a serem consideradas na Fase II dependerão da natureza das observações e serão determinadas em consulta ao órgão registrante.

2.1.h. Cultura de Células (para vírus como agente de controle)

Objetivo

Para o registro de PT ou PF, obter informações sobre a habilidade de agente de controle viral em infectar, replicar, transformar ou causar toxicidade em células de mamíferos.

Definições

1. Forma mais infectiva (FMI): forma ou preparação de vírus que produz infecção máxima em cultura de células suscetíveis ou em organismos. Para vírus não oclusos, a FMI é o vírus purificado (ou tecidos purificados) obtido (s) de um hospedeiro infectado. Para vírus oclusos (por

exemplo baculovírus, vírus de poliedrose citoplasmática, vírus entomopox) a FMI, para cultura de células ou injeção em um organismo, é um vírus extracelular encontrado em meio de cultura de célula ou em hemolinfa. A FMI para insetos hospedeiros suscetíveis através da via natural de infecção (alimentação) é o corpo de inclusão viral;

2. Toxicidade viral: habilidade de um vírus em causar injúria ou dano em uma célula hospedeira quando a infecção e/ou multiplicação não são necessariamente exigidas. A toxicidade pode ser também a habilidade de componentes não-virais de uma preparação para causar injúria ou dano a uma célula hospedeira;
3. Infectividade viral: habilidade de um gen viral se estabelecer em um genoma celular hospedeiro, ou habilidade de genes virais serem expressos em uma célula hospedeira resultando na produção de ácidos nucléicos codificados por vírus;
4. Transformação: modificação detectável do fenótipo de uma célula hospedeira, induzida pela presença de ácido nucléico viral. Células transformadas são consideradas infectadas pelo vírus;
5. Efeito citopático (EC): qualquer dano ou injúria causada a uma célula hospedeira, resultando em infecção por vírus. Esses efeitos podem ser morfológicos ou bioquímicos e incluem o crescimento celular, a fixação, a morfologia, o tamanho e a forma do núcleo, os processos celulares (como síntese macromolecular), etc.

Substância a ser testada

Deve ser utilizada a forma mais pura e infectiva do vírus. As preparações de vírus de insetos só podem conter hemolinfa nos casos em que esta tenha sido determinada como não-tóxica para a cultura de células utilizada. O inóculo deve ser quantificado pelo ensaio mais sensível possível e pelo sistema hospedeiro mais permissível possível (cultura de células ou, se possível, organismo hospedeiro). É exigido para os testes em sistemas modelo um mínimo de cinco unidades formadoras de placas (UFP) por célula quando for disponível um ensaio de placas para o trabalho com o vírus. Se esse ensaio não for possível, torna-se necessário empregar o inóculo com sete vezes o número de unidades formadoras de placas correspondentes à DL_{50} . O requerente deverá apresentar uma justificativa convincente para utilizar um número menor de unidades por células

Cultura de células

São recomendadas as seguintes células e/ou linhagens: (1) uma linhagem humana, (2) uma cultura de células primárias, (3) uma linhagem contínua de primata, (4) embrião de hamster sírio (para fornecer dados sobre a transformação celular, descrita abaixo) e (5) uma outra linhagem de células, que deve ser selecionada para avaliar possíveis problemas intrínsecos do agente de controle viral específico e outros problemas relacionados ao seu uso. Deve-se apresentar a justificativa para a seleção desta última linhagem de células.

Avaliação toxicológica

Devem ser conduzidos testes de eficiência de plaqueamento para cada linhagem de célula. Para cada linhagem, aproximadamente 200 células devem ser plaqueadas em cada uma de um total de 30 placas. Após 24h do plaqueamento, 10 placas por linhagem de células devem ser expostas a aproximadamente 10^6 unidades do vírus; outras 10 placas devem receber um meio apropriado de cultura de células de vertebrados

e, se for o caso, mais 10 placas por linhagem de células devem ser expostas em um meio para células de invertebrados. Uma hora após a exposição, todas as culturas devem receber o meio de cultura de células de vertebrado apropriado, sendo então incubadas até que a cultura-testemunha apresente colônias com, pelo menos, 25 células cada uma. Todas as culturas devem então ser fixadas e coradas, contando-se as colônias.

Avaliação da infecção

1. As culturas originárias (contendo aproximadamente 2×10^5 células em placas de 25cm^2), de cada linhagem celular, devem ser expostas a pelo menos 10^6 unidades do vírus. As culturas-testemunha correspondentes são aquelas que não receberam qualquer tratamento e as que foram expostas a meios de inoculação isentos do vírus;
2. As culturas de células devem ser avaliadas, diariamente, durante 21 dias após a inoculação;
3. A presença do vírus deve ser quantificada 1, 2, 5, 7, 14 e 21 dias após a inoculação, em todas as culturas;
 - I. Devem ser realizadas avaliações em triplicata, sobre a presença de antígenos e ácido nucleico do vírus nas células (toda a colônia ou pelo menos 2×10^5 células);
 - II. O fluido da cultura celular resultante de replicações deve ser avaliado com relação ao vírus, usando o sistema-modelo apropriado do hospedeiro suscetível;
4. Os ensaios para a determinação do destino do vírus e da presença de proteínas e ácido nucleico virais são:
 - I. Para determinação de proteína, podem ser utilizados ELISA ou ensaios similares (Tijssen, 1985 e Smith and Summers, 1981);
 - II. Para a determinação de ácido nucleico, são recomendadas a hibridação em colônia (Bishop, 1983; Kafatos et al., 1979; Brandsma & Miller, 1980), hibridação "Southern" (Southern, 1975; Smith & Summers, 1981) e outros ensaios semelhantes, usando sondas e alta atividade específica;
5. Testemunhas:
 - I. Para cada cultura de células inoculada com a preparação do vírus inativado deve ser feita a análise descrita para o vírus ativo;
 - II. Para cada série de testes, o inóculo deve ser testado na linhagem celular tolerante ou no organismo hospedeiro, resultando em uma testemunha positiva, usada como referência direta aos dados obtidos das linhagens celulares de vertebrados.

Ensaio de Transformação Celular

1. A capacidade do vírus de transformar células primárias de embriões de hamster sírio (EHS) deve ser determinada usando modelos de testes conhecidos e bem estabelecidos. Caso contrário, o requerente deve justificar a razão de tal escolha, demonstrando que o sistema escolhido é apropriado.
2. Testemunhas: é aceitável como testemunha positiva a avaliação de transformações de células de EHS com Adenovírus 7 de macaco (AVS 7). Células de EHS, tratadas com caldo de cultura celular

ou com uma preparação inativa do vírus, servem como testemunhas negativas apropriadas. Deve ser estabelecida a eficiência do procedimento de inativação para evitar transformações. Um teste de eficiência de plaqueamento com células de EHS (ver acima) é considerado como uma testemunha adequada à toxicidade.

3. Se os dados mostrarem que o vírus modifica o fenótipo celular, devem ser inoculadas em hamsters células de culturas derivadas de colônias morfológicamente transformadas, avaliando-se a formação de tumores no animal hospedeiro;
4. Esse ensaio pode ser facultativo caso as avaliações de infectividade demonstrem, conclusivamente, que o ácido nucleico viral não persiste em quaisquer das linhagens celulares empregadas.

Relatório

As seguintes informações devem ser fornecidas para cada teste:

1. Efeito Citopático (EC) em células de camadas individuais:

- I. A ocorrência de EC deve ser descrita de forma que diferencie de efeitos não específicos a destruição celular causada pelo vírus ;
- II. As culturas devem ser analisadas em microscópio, para fornecer evidências da ocorrência de EC, que devem ser relatadas como:
 - 1 + = Indício de modificações morfológicas induzidas pelo vírus;
 - 2 + = Modificações morfológicas definitivas;
 - 3 + = Degeneração de mais de 50% das células;
 - 4 + = Destruição completa das células.
- III. O valor da dose que causa o efeito estudado em 50% das células deve ser calculado por um método estatístico apropriado. Para o cálculo dos resultados de infectividade, somente culturas apresentando EC igual ou superior a 2 são consideradas infectadas.

2. Avaliação Toxicológica:

- I. Detalhes de todos os procedimentos utilizados, incluindo reagentes e materiais, e a sensibilidade e limitações dos ensaios;
 - II. A eficiência dos dados de plaqueamento de culturas tratadas com o vírus e culturas tratadas com o meio para vertebrados (culturas testemunha) e invertebrados;
 - III. Prevenção do processo mitótico ou de interferência com a replicação cromossômica, como indicado, por exemplo, por reduções significativas na eficiência de plaqueamento.
3. Ensaio de caldo de cultura: detalhes dos procedimentos utilizados, incluindo uma discussão de todos os dados que indicarem replicação viral;
 4. Dados de Ensaio de Virose:

- I. Detalhes dos procedimentos utilizados para a detecção de antígenos e ácidos nucleicos virais e a persistência destes na cultura, incluindo reagentes e materiais apropriados, e sensibilidade e limitações do ensaio;
 - II. Concentração intracelular de antígenos e ácidos nucleicos virais, relatados como uma função do número de células (isto é, o número de genoma viral/célula).
5. Ensaio de Transformação Celular:
- I. Detalhes dos protocolos utilizados no ensaio de transformação celular e referências relativas ao ensaio, se existirem;
 - II. Dados da testemunha, incluindo os resultados da eficiência de plaqueamento;
 - III. Dados sobre formação de tumores em animais-teste, caso esse estudo seja exigido.
6. Informações Gerais sobre todos os testes:
- I. A origem de todas as linhagens celulares utilizadas;
 - II. Evidência da falta de agentes casuais/acidentais em linhagens celulares;
 - III. Informações sobre a estabilidade genética de linhagens celulares estabelecidas, e sobre doadores de células primárias.

Progressão da Fase

A necessidade de estudos adicionais é definida com base nos resultados deste estudo e nos dados de outros testes dessa Fase.

Nenhum outro teste será exigido se os dados obtidos mostrarem que o agente viral não é citotóxico e também não infecta, se replica ou transforma qualquer cultura celular.

Se os dados mostrarem que a preparação do agente viral é tóxica para quaisquer das culturas celulares, mas não infecta, se replica ou transforma quaisquer das culturas celulares, então:

1. Deverão ser identificados os componentes tóxicos da preparação;
2. É necessário um estudo de toxicidade aguda para os componentes tóxicos (descrito anteriormente neste protocolo).

Se o agente viral infectar quaisquer das culturas celulares, podem ser necessários estudos sobre os efeitos na reprodução e fertilidade, na oncogenicidade, no potencial de causar imunodeficiência e na infectividade/patogenicidade em primatas.

2.2. Fase II

2.2.a. Toxicidade Aguda

Objetivo

Esta Fase fornece informações sobre os riscos à saúde devido a uma única exposição às toxinas ou aos componentes tóxicos derivados ou associados à substância-teste. Os componentes tóxicos da preparação de AMC devem ser isolados e identificados.

Esses dados são exigidos para o registro do PF e do PT quando forem observados sinais significativos e persistentes de toxicidade na Fase I e na ausência de sinais significativos de infectividade ou patogenicidade.

O objetivo de um estudo de toxicidade aguda é a determinação da DL_{50} , seus limites estatísticos e o ângulo de inclinação, constatados através das observações em um período de 14 dias pós-tratamento.

Definições

1. Toxicidade aguda: é o efeito adverso que ocorre através da administração de uma única dose de um componente, ou componentes, da substância testada;
2. DL_{50} : corresponde à dose estatisticamente calculada de uma substância que causa a morte de 50% dos animais expostos. É expressa em termos de peso das substâncias testadas por unidade de peso do animal e também em termos da proporção (peso/peso) do(s) componente(s) na substância-teste por unidade de peso do animal.

Metodologia

A substância-teste é administrada em doses sucessivas para vários grupos de animais experimentais, usando-se uma dose por grupo, observando-se os possíveis efeitos e mortes ocasionados. Os animais que morrerem durante o teste devem ser necropsiados. Ao final do teste, os animais sobreviventes serão sacrificados e também necropsiados. Os protocolos a serem utilizados são os já existentes para substâncias químicas.

Substância-teste

A substância-teste corresponderá a uma preparação apropriadamente isolada e purificada dos componentes tóxicos. A proporção por peso dos componentes tóxicos na substância-teste deve ser determinada e relatada.

Seleção dos animais

As espécies ou linhagens de animais a serem utilizadas são aquelas para as quais os efeitos tóxicos foram observados nos estudos de toxicidade/patogenicidade da Fase I.

Vias de Exposição

Devem ser estudadas todas as vias (oral, dermal e pulmonar), nas quais se observou toxicidade nos estudos de toxicidade/patogenicidade aguda na Fase I. São necessários testes separados para cada via de exposição.

Progressão da Fase

O órgão registrante informará sobre os testes adicionais a serem exigidos.

2.2.b. Patogenicidade/Toxicidade Subcrônica

Objetivo

Este estudo fornece informações sobre riscos prováveis à saúde, devido à exposição subcrônica a uma preparação de AMC.

Esses dados são necessários para o registro dos PT e PF, quando for observada infectividade significativa e/ou persistência do AMC nos animais-teste, nos estudos da Fase I, na ausência de patogenicidade ou toxicidade significativa. Os estudos também podem ser solicitados para fornecer informações sobre efeitos adversos devido a contaminantes microbianos ou subprodutos tóxicos em uma preparação de AMC.

Substância-teste

1. O PT e o PF, se diferentes, devem ser testados.
2. Normalmente, a forma do AMC a ser testada será equivalente à forma utilizada no teste de patogenicidade/toxicidade aguda da Fase I, que demonstrou sinais significativos de infectividade ou persistência, mas não demonstrou sinais de patogenicidade ou toxicidade.

Seleção de Animais

Espécie e linhagem: as espécies ou linhagens dos animais a serem utilizadas são aquelas nas quais foi observada infectividade/persistência do AMC nos estudos de toxicidade/patogenicidade aguda da Fase I e em cujas nenhum sinal significativo de patogenicidade ou toxicidade ocorreu.

Idade: devem ser utilizados adultos jovens e a variação de peso entre os animais não deve exceder 20% do peso médio de cada sexo.

Sexo e número: pelo menos 10 animais de cada sexo devem ser tratados com o AMC.

Grupos-testemunha

Deve ser mantida, na medida do possível, a mesma divisão de grupos adotada na Fase I. O mínimo requerido é:

1. Um grupo-testemunha de animais não-tratados;
2. Um grupo-testemunha para a substância veículo do AMC, quando a toxicidade do veículo não for conhecida;

3. Um grupo-controle tratado com AMC inativado para avaliação das propriedades tóxicas do AMC. Essa inativação deve ser feita por um meio que permita a manutenção razoável da integridade estrutural do AMC.

Características da dosagem do AMC

1. Dose: uma única dose de, pelo menos, 10^8 unidades do AMC por animal tratado deve ser administrada diariamente em cada animal. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal;
2. Veículo: o veículo mais adequado pode ser qualquer um que permita a manutenção da viabilidade, a capacidade de germinação, a capacidade de evolução do cisto e, em particular para parasitas intracelulares, a capacidade de infecção em um hospedeiro aceitável. O veículo recomendado para o PF é o mesmo material no qual o AMC será distribuído, misturado, suspenso ou diluído para aplicação em campo.

Metodologia

A substância-teste deve ser administrada diariamente em uma dose alta, por um período de pelo menos 90 dias consecutivos, no qual os animais devem ser observados diariamente para se detectar sinais de toxicidade ou patogenicidade. Os animais que morrerem durante o teste, bem como os sobreviventes ao final do teste, deverão ser sacrificados e necropsiados tendo então os tecidos, os órgãos e os fluidos corpóreos analisados para a quantificação da presença do AMC. Devem ser adotados os mesmos procedimentos da Fase I quanto à observação diária dos animais, à necropsia e ao exame patológico, à quantificação do AMC em órgãos, tecidos e fluidos corporais, além da elaboração do relatório.

Observação dos Animais Tratados

Um exame clínico cuidadoso de todos os animais deve ser feito pelo menos uma vez ao dia. Observações adicionais devem ser feitas também diariamente, no sentido de resgatar os dados dos animais que morrerem durante o estudo (isto é, necrópsia e registro do AMC deles), além do isolamento de animais fracos ou moribundos. O momento da morte de cada animal deve ser anotado com a maior precisão possível. O consumo de alimento e água deve ser determinado semanalmente durante o estudo.

Registro do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos

A presença do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos deve ser avaliada utilizando-se técnicas quantitativas sensíveis nos animais que morrerem durante os estudos e, por ocasião da necrópsia, em animais que sobreviverem até o final do experimento. Os limites de sensibilidade do método empregado devem ser relatados.

O AMC deve ser quantificado em rins, fígado, cérebro, pulmões, baço, sangue e nódulos linfáticos representativos. É possível que outros tecidos, órgãos e fluidos corpóreos tenham que ser examinados de acordo com a natureza dos efeitos tóxicos e patogênicos observados.

Relatório

Além das informações especificadas em “Elaboração de Relatórios” (item 1.3 deste documento), os seguintes dados devem ser relatados:

1. Número de animais no início do teste;
2. Momento da morte de cada animal;
3. Número de animais mostrando sintomas de toxicidade ou patogenicidade;
4. Descrição de efeitos tóxicos e patogênicos;
5. Unidade do AMC utilizada e número destas unidades administrado por animal;
6. Peso corpóreo dos animais e idade;
7. Consumo de alimento e água;
8. Resultado das necrópsias;
9. Patologias e infectividades encontradas;
10. Quantificação do AMC de tecidos, órgãos e fluidos corpóreos, e métodos utilizados, sua sensibilidade e limitações de detecção;
11. Confirmação de que cada método de quantificação é suficientemente sensível para servir na avaliação do AMC em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos.

Deve-se incluir uma avaliação da relação entre a exposição à substância testada e a incidência e severidade de todas as anomalias, incluindo anomalias comportamentais e clínicas, lesões, alterações de peso corpóreo, mortalidade, intoxicações, infectividade e patogenicidade.

Progressão da Fase

1. Se forem observados sinais significativos ou persistentes de patogenicidade do AMC para os animais testados, o órgão registrante deverá ser consultado para determinar a necessidade de condução de outros testes adicionais. A capacidade do AMC de cruzar as barreiras naturais do hospedeiro à infecção pode ser considerada como uma característica patogênica, ainda que não sejam constatados sinais evidentes de doença;
2. Se forem observados efeitos tóxicos na ausência de efeitos patogênicos significativos, então:
 - I. O(s) componente(s) tóxico(s) do material administrado deve(m) ser identificado(s) e, na medida do possível, isolado(s);
 - II. Um estudo de toxicidade aguda deve ser conduzido com o(s) componente(s) tóxico(s);
3. Caso não sejam observados sinais de infectividade, patogenicidade e toxicidade, nenhum teste subsequente será exigido. Entretanto, o requerente deverá apresentar uma avaliação detalhada de possíveis conseqüências da persistência do AMC no organismo hospedeiro;
4. Se for observada infectividade significativa na ausência de patogenicidade/toxicidade deverá ser realizado o estudo dos efeitos sobre a reprodução e fertilidade.

2.3. Fase III

2.3.a. Efeitos sobre reprodução e fertilidade

Este documento trata do estudo sobre o efeito de um AMC na reprodução, no desenvolvimento embrionário e na fertilidade em uma geração de animais. Os efeitos a serem estudados incluem a quantificação de fêmeas que não engravidam, o número de partos normais e o de reabsorções, o tamanho da prole, o período de prenhez, a mortalidade dos embriões e o peso dos descendentes. Também deve ser avaliada a transmissão do AMC dos pais aos descendentes.

Esses dados são exigidos para o registro de cada PF que corresponda a uma das seguintes possibilidades:

1. Quando for observada infectividade significativa nos testes subcrônicos da Fase II, na ausência de sinais de toxicidade ou patogenicidade;
2. O AMC é um vírus que pode persistir ou replicar em culturas de linhagens de células de mamíferos;
3. O AMC não pode ser adequadamente identificado taxonomicamente, mas está relacionado a organismos reconhecidamente parasíticos às células de mamíferos;
4. A preparação de AMC não é suficientemente purificada e existem indicações de que ela possa conter contaminantes que são parasitas de mamíferos.

Metodologia

O AMC deve ser administrado a machos e fêmeas, antes de seu acasalamento e às mães, durante a prenhez.

Substância-teste

O teste deve ser conduzido preferencialmente com o PT.

Animais a serem utilizados

1. *Espécie e linhagem*: deve-se preferir o uso de camundongos ou ratos de linhagem conhecida e com bons níveis de fecundidade. Os animais devem ser livres de parasitas e patógenos e as fêmeas nulíparas;
2. *Idade*: os animais a serem testados devem ter de 6 a 8 semanas de idade, antes da administração da primeira dose;
3. *Sexo*: devem ser estudados tanto machos quanto fêmeas;
4. *Números*: cada grupo tratado e testemunha deve conter pelo menos 20 machos e um número suficiente de fêmeas para possibilitar pelo menos 20 fêmeas prenhes.

Grupos-testemunha

1. Um grupo-testemunha não-tratado;
2. Um grupo-testemunha para a substância veículo do AMC quando a toxicidade do veículo não for conhecida;
3. Um grupo tratado com AMC inativado para a avaliação das propriedades tóxicas de cada AMC. Essa inativação deve ser feita por um meio que permita a manutenção razoável da integridade estrutural do AMC.

Características da dosagem do AMC

1. Dosagem: deve ser utilizada uma dose de pelo menos 10^8 unidades de AMC por animal-teste. Se a dose utilizada for menor, o requerente deve justificar a razão para tal. A quantificação das unidades de AMC deve ser feita na hora da administração;
2. Via de Administração: a via utilizada normalmente é a oral. Outras vias devem ser usadas caso a persistência ou infectividade através delas seja observada na Fase I;
3. Frequência da Administração: deve ser aquela necessária para manter uma quantidade significativa de AMC nos pais, antes e durante o período de acasalamento e nas mães, durante a prenhez.

Acasalamento dos Animais

Para o acasalamento, cada fêmea deve ser colocada com um único macho tomado ao acaso até que a prenhez ocorra ou por um período máximo de três semanas. A fêmea a ser acasalada deve estar preferencialmente no período estrogênico. Recomenda-se o exame externo dos órgãos reprodutores e dos ciclos estrais e espermatogênicos, antes do acasalamento. Caso não ocorra a fertilização, os animais podem ser acasalados com outros machos ou fêmeas, ou ainda terem avaliados seus órgãos reprodutores.

A cada manhã a fêmea deve ser examinada para a verificação da presença de esperma ou tampão vaginal, quando será considerado o dia 0 (zero) da prenhez. As fêmeas prenhes devem ser mantidas em gaiolas separadas contendo material para nidificação na ocasião próxima à data prevista do parto, quando deve cessar a administração do AMC. As gaiolas e os outros materiais utilizados durante o estudo devem ser livres de contaminação com o AMC.

Observação dos Animais

As observações dos animais devem ser realizadas desde o início da administração do AMC até o sacrifício dos filhotes. Observações adicionais devem ser feitas diariamente, como a necrópsia de animais mortos e o registro do AMC neles, além do isolamento de animais fracos ou moribundos.

Outras observações a serem realizadas incluem:

1. Pele e pêlo;
2. Olhos e mucosas;

3. Sistema respiratório;
4. Sistema circulatório;
5. Sistema nervoso periférico e central;
6. Atividade somatomotora;
7. Comportamento (atenção especial deve ser dada à ocorrência de tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação, sono e coma).

O peso de cada animal deve ser determinado imediatamente antes da administração do AMC, semanalmente durante o teste e por ocasião da morte ou do sacrifício final. O momento da morte de cada animal deve ser anotado com a maior precisão possível.

Observação das fêmeas prenhas

Devem ser registrados o consumo de alimentos e o período de prenhez, além das informações clínicas anteriormente citadas. A duração da gestação deve ser calculada a partir do dia zero da prenhez. Cada ninhada deve ser examinada logo que possível após o parto, observando-se o número de filhotes natimortos e o de nascidos vivos, além da presença de anomalias físicas ou comportamentais. Os filhotes devem ser pesados, logo que possível, após o nascimento.

Quantificação do AMC nos pais e na progênie

A infectividade ou persistência deve ser avaliada, utilizando-se técnicas sensíveis para a determinação da presença do AMC nos animais. Os órgãos, tecidos e fluidos corpóreos de cada pai devem ser avaliados no momento em que se confirmar que a mãe correspondente esteja prenhe. As mesmas avaliações devem ser feitas em cada mãe, logo após o nascimento dos filhotes e um dia após o nascimento, nos descendentes.

Relatório

Uma avaliação dos resultados deve incluir um relatório de todos os efeitos do AMC nos animais-teste, todas as observações feitas, análise estatística, quantificação do AMC na preparação administrada, nos pais e nos descendentes, evidência de que um nível significativo do AMC foi mantido nos pais, cronograma de administração e peso dos animais. Também deve incluir uma avaliação da relação, ou da ausência de relação, entre a presença do AMC nos pais e efeitos anormais na reprodução e fertilidade.

Além das informações especificadas em "Elaboração de Relatórios" (item 1.3 deste documento), devem ser relatados os seguintes dados:

1. Espécie e linhagem;
2. Índices de fertilidade e duração da gestação;
3. Momento da morte de qualquer animal durante o estudo;
4. Efeitos na reprodução e na progênie;
5. Momento da observação de cada sinal anormal, incluindo patogenicidade e seu curso subsequente;

6. Peso corpóreo dos pais e da progênie;
7. Dados de necrópsia;
8. Quantificação do AMC;
9. Análise estatística dos resultados, quando apropriado.

Progressão da Fase

Qualquer teste adicional exigido será determinado em consulta ao órgão registrante.

2.3.b. Efeitos Oncogênicos

O potencial para efeitos oncogênicos existe quando um componente da formulação de um AMC for um vírus e quando qualquer um dos critérios seguintes for pertinente:

1. O vírus é um componente intencional, ou não intencional, do produto e é reconhecidamente oncogênico para mamíferos, ou é muito relacionado a tal vírus;
2. O vírus é um componente intencional, ou não intencional, do produto e é capaz de transformar células de mamíferos no estudo conduzido com culturas de células;
3. Os esforços para a caracterização de um vírus de um produto não são suficientes para se concluir se ele é potencialmente oncogênico.

Esses dados são exigidos para o registro de cada PF ou PT quando o potencial para causar efeitos oncogênicos em mamíferos for indicado pela presença de certos componentes virais do produto. Os detalhes do teste serão decididos para cada caso, em consulta ao órgão registrante.

2.3.c. Indução de imunodeficiência

O potencial de causar imunodeficiência em mamíferos existe quando um componente do AMC for um vírus que reconhecidamente possa interagir com os componentes do sistema imunológico de mamíferos ou ainda quando for relacionado a tal tipo de vírus.

Esses dados podem ser exigidos para o registro de um PF ou PT quando houver a indicação de que o produto possa causar um estado de imunodeficiência em mamíferos. Os detalhes do teste serão decididos para cada caso, em consulta ao órgão registrante.

2.3.d. Infectividade/patogenicidade a primatas

Esses dados podem ser exigidos para o registro de cada PF ou PT quando:

1. O potencial de infectividade, patogenicidade, oncogenicidade ou imunodeficiência for indicado pela presença de certos parasitas intracelulares no produto;
2. Existir um potencial para efeitos adversos em primatas, nos casos em que um componente da

formulação do AMC, durante pelo menos um estágio de seu desenvolvimento, puder ser parasita intracelular de células de mamíferos e quaisquer dos dois critérios seguintes forem pertinentes:

- I. Um dos componentes da formulação do AMC é um vírus capaz de causar efeitos citopáticos e replicar em células de linhagens de um mamífero hospedeiro;
 - II. Um componente da formulação do AMC é um parasita conhecido de células de mamíferos.
3. Efeitos patogênicos positivos não totalmente esclarecidos na Fase I forem específicos ao animal-teste utilizado;
 4. As características taxonômicas do AMC indicam a existência de risco de patogenicidade humana por esse organismo.

Os detalhes do teste serão decididos para cada caso, em consulta ao órgão registrante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISHOP, D.H.L. The application of RNA finger printing and sequencing to viral diagnosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.104, p.259-271, 1983.
- BRANDSMA, J.; MILLER, G. Nucleic acid spot hybridization: rapid quantitative screening of lymphoid cell lines for Epstein-Barr viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.77, p.6851-6855, 1980.
- BRASIL. Secretaria do Meio Ambiente. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, 1988. 351 p.
- CASTO, B.C. Adenovirus transformation of hamster embryo cells. **Journal of Virology**, v.2, p.376-383, 1968.
- CASTRO, V.L.S.S.; CAPALBO, D.M.F.; SOARES, C.M.; COSTA, F.P. Avaliação da exposição de pesticidas biológicos (*Bacillus thuringiensis*) em ratos. **Brazilian Journal of Toxicology**, v.8, n.1, p.268, 1995.
- CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MAIA, A. Toxicity and pathogenicity evaluation of entomopathogens: trends and challenges. In: **NEW studies in ecotoxicology: papers resulting from posters given at the Welsh Pest Management Forum conference: ecotoxicology, pesticides and beneficial organisms**, 1996, Cardiff, UK. Cardiff: University of Wales, 1997. p.13-14.
- GEORGE, S. E.; KOHAN, M. J.; WHITEHOUSE, D. A. Distribution, clearance, and mortality of environmental *Pseudomonads* in mice upon intranasal exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8, p.2420-2425, 1991.
- GEORGE, S. E.; KOHAN, M. J.; GILMOUR, M. I. Pulmonary clearance and inflammatory response in C3H/HeJ mice after intranasal exposure to *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.11, p. 3585-3591, 1993.
- GEORGE, S. E.; KOHAN, M. J.; TAYLOR, M. S. Intestinal survival, competition and translocation of biotechnology agents on intranasal exposure of C3H/HeJ mice. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.13, n.7, p. 1145-1152, 1994.
- HAMES, B.D.; HIGGENS, S.J., ed. **Nucleic acid hybridisation: a practical approach**. Washington, D.C.: IRL Pres, 1985.
- HEIDELBERGER, A. Cell transformation by chemical agents: a review and analysis of the literature - a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.114, p.283-385, 1983.
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol: acute dermal testing of a Biochemical Pesticide**. Chicago, [s.d.]. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol: acute intravenous toxicity/pathogenicity testing of a microbial pesticide**. Chicago, [s.d.]. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol: acute pulmonary toxicity/pathogenicity testing of a microbial pesticide**. Chicago, [s.d.]. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Generic Draft Protocol: pulmonary toxicity/pathogenicity testing of following acute intratracheal challenge rats**. Chicago, [s.d.]. 8p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure: dosing or injection of rodents and rabbits by various routes**. Chicago, [s.d.]. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure: limited necropsy procedure - rodent**. Chicago, [s.d.]. 6p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure: method of dose administration for acute dermal toxicity**

- studies in rabbits or rats. Chicago, [s.d.]. 2p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure: microbial pesticide - method of detection - sensitivity assay.** Chicago, [s.d.]. 3p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Standard Operating Procedure: obtaining and processing animal tissues for microbial quantitation.** Chicago, [s.d.]. 8p. (IITRI Project Study, 1).
- IIT RESEARCH INSTITUTE. **Test article usage log.** Chicago, [s.d.]. 12p. (IITRI Project Study, 1).
- INMETRO. **Princípios das boas práticas de laboratório.** Rio de Janeiro: SENAI: DN-NID/INMETRO, 1995. 48p. (INMETRO-CTLE 06).
- KAFATOS, F.C.; JONES, C.W.; EFSTRATIADIS, A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. **Nucleic Acids Research**, v.7, p.1541-1552, 1979.
- McINTOSH, A. H.; SHAMY, R. Biological studies of a baculovirus in a mammalian cell line. **Intervirology**, v.13, p.331-341, 1980.
- PESTICIDE Assessment Guidelines – Subdivision M. Microbial Pest Control Agents and Biochemical Pest Control Agents. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, 1989. 192 pp.
- SHERWOOD, R.; THOMAS, P.; KAWANISHI, C.; FENTERS, J. Comparison of streptococcus zooepidemicus and influenza virus pathogenicity in mice by three pulmonary exposure routes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1744-1751, 1988.
- SMITH, G.; SUMMERS, M.D. Application of a novel radioimmunoassay to identify baculovirus structural proteins that share interspecies antigenic determinants. **Journal of Virology**, v.39, p.125-137, 1981.
- SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p.503, 1975.
- TIJSSSEN, P. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: practice and theory of enzyme immunoassays.** Amsterdam: Elsevier, 1985.

AGRADECIMENTOS

Consignamos nossos agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração desta publicação e em especial ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), United States Environmental Protection Agency (USEPA), e aos empregados da Embrapa Meio Ambiente pelo estímulo à execução deste trabalho.

Embrapa

Meio Ambiente

