




DOCUMENTO GENERAL

Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

PROTOCOLOS DE EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA Y PATOGENICIDAD DE LOS PRODUCTOS MICROBIANOS DE CONTROL DE PLAGAS EN ORGANISMOS NO OBJETIVOS

Tabla de contenidos

1. Ámbito de aplicación.....	3
2. Fundamento:	3
3. Procedimiento.....	3
3.1 Directriz de prueba de organismos no objetivo y expresión ambiental	3
3.1.1 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad de los PMCP en aves	3
3.1.2 Evaluación de toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en anfibios y reptiles	4
3.1.3 Evaluación de toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en abejas.....	4
3.1.4 Evaluación de la patogenicidad y/o toxicidad de los PMCP en plantas	5
3.1.5 Evaluación de la patogenicidad y/o toxicidad de los PMCP sobre lombrices.	5
3.1.6 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en peces	7
3.1.7 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en organismos invertebrados acuáticos	7
3.1.8 Protocolo de toxicidad y/o patogenicidad de PMCP sobre plantas acuáticas	8
3.1.9 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad oral, inhalatoria y dérmica aguda de PMCPs en mamíferos.	9

	DOCUMENTO GENERAL
	Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

1. **Ámbito de aplicación**

Protocolos para evaluar la toxicidad y patogenicidad de PMCP en el medio ambiente.

2. **Fundamento:**

Se requiere contar con un conocimiento básico de la biología del(os) agente(s) microbiano(s) de control de plagas (AMCP) que compone(n) al bioplaguicida junto con estudios de toxicidad y patogenicidad en organismos no objetivos para poder determinar su impacto sobre la plaga y el ecosistema. Estos antecedentes permiten evaluar los potenciales riesgos del bioplaguicida o producto microbiano de control de plagas (PMCP) en el medio ambiente junto con entregar la información mínima requerida para que la entidad regulatoria, Servicio Agrícola Ganadero, pueda discernir si estos se consideran aceptables o no.

A continuación, se entregan las directrices y protocolos que permitirán realizar el levantamiento de esta información que es un requisito que establece la Resolución Exenta del Servicio N° 9.074 de 2018, para el registro de PMCP.

3. **Procedimiento**

3.1 Directriz de prueba de organismos no objetivo y expresión ambiental

3.1.1 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad de los PMCP en aves

Para determinar la toxicidad de los AMCP en aves se recomienda realizar el protocolo de la EPA "OCSPP 885.4050 Avian Oral Nivel I" [EPA 712-C-96-329]. En este estudio, se administra una dosis máxima diaria (DMD) a codornices jóvenes o patos reales durante cinco días con un período de observación de al menos 25 días. Si se manifiesta algún signo de patogenicidad y/o toxicidad en el día 30, la observación debe continuar hasta que se establezca la recuperación, la mortalidad o la morbilidad inequívoca.

a. Observaciones y consideraciones del protocolo OCSPP 885.4050


El grupo de tratamiento va acompañado de tres grupos de control diferentes:

- Un grupo de control negativo sin dosis.
- Un grupo de control de la infectividad tratado con el PMCP inactivado de tal manera que retenga la integridad estructural de la célula.
- Un grupo de control en el que se dosifica a las aves con filtrado estéril de cultivos de producción del AMCP.

b. Opciones de exención

Se puede presentar una exención:

- Si se espera que la exposición de aves y mamíferos sea mínima o insignificante. Se debe realizar una justificación robusta para presentar esta opción de exención.
- Si se dispone de información significativa para el AMCP, por ejemplo, un conocimiento profundo de la biología, la información sobre las características de temperatura de crecimiento, ciclo de vida, modo de acción, destino y comportamiento en el compartimento ambiental. Esta información se debe basar en una investigación bibliográfica proveniente de fuentes científicas de reconocimiento internacional.

	DOCUMENTO GENERAL
	Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

3.1.2 Evaluación de toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en anfibios y reptiles

Estudios de efectos con anfibios y/o reptiles solo se debe proporcionar en el caso de que la susceptibilidad se informe en la literatura científica, o si hay evidencia sólida de efectos adversos basados en las propiedades biológicas del AMCP.

3.1.3 Evaluación de toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en abejas

Se recomienda realizar el protocolo de la EPA "OCSPP 885.4380 Honey Bee Testing Tier I" [EPA 712-C-96-337].

a. Observaciones y consideraciones del protocolo OCSPP 885.4380

- No se define dosis máxima de riesgo (DMR)
- Se debe evaluar hasta 100 veces la DL50 o CL50 del PMCP en su hospedero natural, o 10-100 veces la dosis recomendada en condiciones de campo.
- El método de aplicación depende de la vía de exposición esperada, ya sea oral o por contacto o incluso en toda la colmena.
- La duración recomendada de la prueba es mayor o igual a 30 días. En el caso de que se espere que el PMCP afecte las larvas de abejas melíferas, estas se deben incluir como organismos de prueba.
- También pueden ser necesarias pruebas adicionales a largo plazo o (semi) campo si se observan efectos en pruebas de nivel I (ensayos *in vitro*).

b. Observaciones y consideraciones del protocolo OCSPP 885.4380

- Si los efectos observados son causados por toxicidad, se deben realizar pruebas de dosis-respuesta que proporcionen criterios de valoración ecotoxicológicos fiables (CL50, DL50, CSEO). Estos criterios de valoración pueden integrarse en evaluaciones de riesgo estándar similares a los pesticidas químicos, incluido el uso de factores de seguridad establecidos.
- Explorar el origen de los efectos observados en los grupos de control que reciban un tratamiento atenuado (material libre de microbios o microbio no viable que comprende material del sistema de cultivo utilizado para la propagación) podría ser útil, ya que los efectos adversos causados por este tratamiento no se deben a la patogenicidad.
- De acuerdo con la directriz OCSPP 885.4340 de la EPA de EE. UU., La DMR es hasta 10-100 veces mayor que la dosis de campo recomendada, por lo que comprende un factor de seguridad de 10-100.
- En casos de efectos patógenos, estas observaciones deben ser consideradas y clasificadas en el contexto del conocimiento general sobre el AMCP (rango de hospederos fisiológicos y ecológicos, modo de acción, ciclo de vida y biología del AMCP, condiciones ambientales para la supervivencia, germinación e infección).
- Dado que los abejorros tienen una temperatura de colmena mucho más baja en comparación con las abejas melíferas, podrían ser más susceptibles a los AMCP. En particular a los HEP presentan temperaturas de crecimiento óptimas más bajas. Esto debe tenerse en cuenta. Las pautas de estudio adicionales adaptadas a los abejorros podrían ser útiles.
- Los HEP pueden tener amplios rangos de hospedadores, incluidos artrópodos no objetivo. En tales casos, se puede aceptar algún nivel de efecto patógeno sobre artrópodos no objetivo.

c. Opciones de exención

Se puede presentar una exención:

- Si la exposición de las abejas es insignificante o mínima.
- En el caso de que el AMCP no sea entomopatógeno y no se encuentren antecedentes en la literatura científica de efectos nocivos de la especie del AMCP en abejas y otras especies estrechamente relacionadas al AMCP que compartan el mismo hábitat ecológico.

3.1.4 Evaluación de la patogenicidad y/o toxicidad de los PMCP en plantas

Para la evaluación de la toxicidad de PMCP que no sean herbicidas, se recomienda realizar el protocolo de la OECD 208 debido a que este protocolo evalúa fitotoxicidad. En el caso de que el PMCP corresponda a un herbicida se sugiere realizar el protocolo que estipula la EPA OCSPP 850.4300 que evalúa patogenicidad y fitotoxicidad en potenciales cultivos objetivos del AMCP.

a. Consideraciones del protocolo de la OECD 208

- Selección de la(s) especie(s) de prueba: Se deberá seleccionar una especie de prueba para cada cultivo en el que se requiera registrar el PMCP. Se sugiere utilizar las especies que históricamente han sido empleadas en ensayos de fitotoxicidad. El listado de especie se indica en el anexo 2 del protocolo de la OECD.
- Concentración de prueba: Se puede realizar una curva dosis-respuesta o evaluar una única concentración. En este último caso, se debería emplear la concentración máxima de PMCP que se haya determinado para el control de la enfermedad o peste en el cultivo objetivo.
- Exposición: Las semillas se ponen en contacto con el suelo inoculado con el PMCP y se evalúan los efectos después de 14 a 21 días después de la emergencia del 50% de las plántulas en el grupo de control.
- Control: suelo no inoculado

b. Consideraciones y observaciones del protocolo OSPP885.4300

- Selección de la(s) especie(s) de prueba: El número y tipo de especies analizadas depende de la similitud del AMCP con patógenos vegetales conocidos. Debe proporcionarse una justificación para la selección de las especies a ensayar. Se recomiendan cultivos agrícolas comerciales. Las especies para realizar las pruebas se enumeran en el protocolo OCSPP 850.4300.
- Concentración de prueba: Debe probarse una sola concentración, la cual corresponde a la máxima concentración de PMCP que se indicará en la etiqueta del herbicida biológico.
- Control: Deben incluirse controles negativos (no tratados) y positivos. El control positivo corresponde a la aplicación del herbicida microbiano en la maleza plaga objetivo.
- Duración de la prueba: las plantas deben observarse semanalmente o con mayor frecuencia hasta la cosecha normal o la muerte o, en el caso de las plantas perennes, a intervalos regulares durante al menos 2 años.

3.1.5 Evaluación de la patogenicidad y/o toxicidad de los PMCP sobre lombrices

Para realizar la evaluación del PMCP en lombrices se recomienda realizar el protocolo que se describe en el Reporte EPS 1/RM/44 del Centro de consultas públicas sobre medio ambiente y cambio climático de Canadá.


a. Observaciones y consideraciones del protocolo EPS 1/RM/44

- Especies de prueba: *Eisenia andrei* (también denominada *Eisenia foetida andrei*) o la especie estrechamente relacionada *Eisenia fetida*.
- Ensayo de infectividad: La infectividad se examina midiendo la concentración de sustancia microbiana en el homogeneizado de organismo completo de lombrices de tierra de cada tratamiento durante y / o al final de la prueba.
- Vía de exposición: la vía de exposición se lleva a cabo mezclado el suelo con el PMCP de ensayo o a través de los alimentos.
- Concentración de prueba: Es posible utilizar solo una concentración (es decir, DMR) en una prueba de concentración única o un mínimo de siete concentraciones que incluyen la DMR. La DMR utilizada para la mezcla de suelo se define como 10^6 unidades microbianas/g de suelo (peso seco), o 1000 veces la concentración microbiana esperada en el suelo. La DMR utilizada en el alimentos corresponde a 100 veces la concentración máxima de microorganismos especificada en el PMCP.
- Control: Deben incluirse controles negativos (no tratados) y positivos. Se recomienda encarecidamente el uso de un control no infeccioso. Un control de filtrado estéril es opcional, pero también se recomienda.
- Observaciones y criterios de valoración biológicos: se debe registrar el número total de gusanos adultos vivos en los días 0 y 28, el número de gusanos juveniles vivos el día 56, síntomas patológicos obvios (por ejemplo, heridas abiertas) o anomalías de comportamiento distintas (por ejemplo, letargo). Los criterios de valoración biológicos se determinan para el número total de gusanos adultos supervivientes el día 28, el peso seco total y el número de gusanos juveniles supervivientes el día 56, el número de gusanos adultos supervivientes que muestran una apariencia y / o comportamientos atípicos el día 28 y 56.
- Duración de la prueba: Los efectos sobre la supervivencia, la reproducción y el crecimiento deben evaluarse en un plazo de 56 días.
- Criterios de validez: Las pruebas se consideran inválidas si la supervivencia media a los 28 días de adultos en suelo de control negativo es menor a 90%, si la tasa de reproducción media de los adultos en el suelo de control negativo es menor a 3 individuos juveniles vivos / adultos y si el peso seco medio de los juveniles vivos individuales en el suelo de control negativo al final de la prueba es menos a 2 mg.

b. Evaluación de riesgos

- En general, se considera que un cálculo de riesgo análogo a los productos químicos es menos factible para las evaluaciones de riesgo de los PMCP porque las relaciones dosis-respuesta rara vez se observan en casos de efectos patógenos.
- Si los efectos observados son causados por toxicidad, se deben realizar pruebas de dosis-respuesta que proporcionen criterios de valoración ecotoxicológicos fiables (CL50, TL50, CSEO). Las Directrices canadienses ofrecen la opción de pruebas de concentración múltiple. Estos criterios de valoración pueden integrarse en evaluaciones de riesgo estándar similares a los pesticidas químicos, incluido el uso de factores de seguridad establecidos. Explorar el origen de los efectos observados en los grupos de control que recibieron un tratamiento atenuado (material libre de microbios o microbio inviable que comprende material del sistema de cultivo utilizado para la propagación) podría ser útil, ya que los efectos adversos causados por este tratamiento no se deben a la patogenicidad.

c. Opciones de exención

	DOCUMENTO GENERAL
	Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

Se puede presentar una exención:

- Si la exposición de las lombrices de tierra es insignificante o mínima.
- Si se dispone de un conocimiento profundo sobre el modo de acción, biología, ciclo de vida y medio ambiente condiciones para la supervivencia y reproducción del AMCP excluyendo cualquier riesgo para las lombrices de tierra.

3.1.6 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en peces

Se recomienda emplear el protocolo de la EPA "OCSPP 885.4200 freshwater fish testing in Tier" [EPA 712-C-96-332], que corresponden pruebas de peces de agua dulce a nivel I (ensayos *in vitro*).

a. Consideraciones de la EPA OCSPP 885.4200

- Especies de prueba: En casos de aplicación indirecta, como la deriva por aspersión, se requiere una especie de prueba, preferiblemente trucha arco iris. En los casos de aplicaciones directas al agua, se requieren dos especies de prueba, preferiblemente trucha arco iris y pez luna de agallas azules. Además, se recomienda el uso de alevines.
- Vía de exposición: Los organismos de prueba deben exponerse por dos vías, primero a través de la suspensión directa del PMCP en el agua y, en segundo lugar, mediante la mezcla del PMCP con alimentos. La concentración del PMCP mezclado con el alimento debe ser al menos 100 veces la concentración de densidad celular calculada/mL en una muestra de PMCP, la mezcla debe ser resuspendida en una capa de agua de 6 pulgadas (15 cm) inmediatamente después de una aplicación directa a una capa de agua de 6 pulgadas (15 cm).
- Concentraciones de prueba: Las pruebas deben realizarse con un DMR de 10^6 unidades/mL o 1000 veces la concentración microbiana esperada en el ambiente acuoso.
- Control: un grupo de control negativo, sin dosificación, debe ejecutarse al mismo tiempo que los grupos de prueba.
- Un grupo de control en el que los peces están expuestos a filtrado estéril de cultivos de producción debe realizarse al mismo tiempo que los grupos de prueba.
- Duración de la prueba: la duración de la prueba es mayor o igual a 30 días.

b. Opciones de exención


Se puede presentar una exención:

- Si la exposición de los peces es insignificante o mínima.
- Si un microorganismo no puede sobrevivir en aguas superficiales y sedimentos.
- Si la búsqueda bibliográfica científica internacional no se encuentran informes de impactos perjudiciales para los peces causados por microorganismos y especies relacionadas dentro de la misma subfamilia o género del AMCP.

3.1.7 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad de PMCP en organismos invertebrados acuáticos

La evaluación de efectos adversos de PMCP sobre los invertebrados acuáticos debe abordarse si existe la posibilidad de exposición a la aplicación de PMCP a ecosistemas de agua dulce. Se recomiendan realizar el protocolo descrito en el Reporte EPS 1/RM/44 del Centro de consultas públicas sobre medio ambiente y cambio climático de Canadá.

a. Observaciones y consideraciones del protocolo de toxicidad y/o patogenicidad

	DOCUMENTO GENERAL
	Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

- Especie de prueba: Se recomienda evaluar toxicidad y/o patogenicidad sobre invertebrados acuáticos de agua dulce, empleando como modelo de evaluación a *Daphnia magna*.
- Concentración de prueba: las sustancias de prueba se pueden aplicar en una sola concentración DMR o aplicar en un mínimo de cinco concentraciones.
- Control: además de los grupos de control negativo y control de filtrado estéril (opcional), se recomienda encarecidamente un control no infeccioso.
- Observaciones y criterios de valoración biológica: se requiere la supervivencia de los dáfidos parentales y el éxito de la reproducción, mientras que las pruebas de infección mediante mediciones de la concentración microbiana en el homogeneizado de cuerpo entero son opcionales.
- Duración de la prueba: la duración de la prueba es de 21 días.

b. Protocolos adicionales

- Es posible que se requieran pruebas con el invertebrado de sedimentos de agua dulce *Chironomus tentans* o *C. riparius* cuando el PMCP se precipitan rápidamente en el sedimento y probablemente pueden persistir en el sedimento durante una cantidad de tiempo prolongado. El Reporte EPS 1/RM/44 del Centro de consultas públicas sobre medio ambiente y cambio climático de Canadá también entrega las directrices para la evaluación de PMCP sobre prueba de supervivencia y crecimiento en larvas de mosquitos de agua dulce (*Chironomus tentans* o *Chironomus riparius*)” en sedimentos.
- Los organismos de prueba son *C. tentans* de tercer estadio y *C. riparius* de primer estadio.
- Las sustancias de ensayo deben mezclarse tanto en agua dulce como en sedimentos.
- Es posible realizar una prueba de concentración única utilizando el DMR definido anteriormente o una prueba de concentración múltiple con un mínimo de cinco concentraciones, incluido el DMR.
- Se debe determinar un control negativo, un control positivo (químico) mientras que se recomienda encarecidamente la realización simultánea de un control no infeccioso y un control de filtrado estéril es opcional.
- Las observaciones incluyen el número de larvas de jerjeles en la superficie del sedimento y la evaluación de su comportamiento, apariencia y supervivencia. Debe medirse el peso seco medio. La prueba de infección midiendo la concentración microbiana en el homogeneizado de cuerpo entero es opcional.
- Las pautas de prueba proporcionan condiciones experimentales específicas y criterios de validez.

c. Opciones de exención

Se puede presentar una exención:

- Si la exposición de los invertebrados acuáticos es insignificante o mínima.
- En caso de AMCP no es entomopatógeno, si la búsqueda bibliográfica científica internacional no se encuentran informes de impactos perjudiciales para subfamilia o género en los invertebrados acuáticos y terrestres causados por microorganismos y especies relacionadas dentro de la misma subfamilia o género del AMCP.
- Si un microorganismo no puede sobrevivir en aguas superficiales y sedimentos.

3.1.8 Protocolo de toxicidad y/o patogenicidad de PMCP sobre plantas acuáticas

La evaluación de efectos adversos de PMCP sobre plantas acuáticas debe abordarse si existe la posibilidad de exposición a la aplicación de PMCP a ecosistemas de agua dulce.

Se recomienda realizar el protocolo que se describe en la guía de evaluación de la patogenicidad y toxicidad de nuevas sustancias microbianas para organismos acuáticos y terrestres correspondiente al Reporte EPS 1/RM/44 del Centro de consultas públicas sobre medio ambiente y cambio climático de Canadá.

a. Observaciones y consideraciones del protocolo de toxicidad y/o patogenicidad

- Especie de prueba: *Lemna minor* se emplea como especie de prueba.
- Tiempo de exposición: Se debe exponer *L. minor* como organismo de prueba durante 7 días al PMCP con una renovación de cada concentración de prueba al menos dos veces (los días 3 y 5 de la prueba).
- Concentración de prueba: El PMCP se pueden aplicar como DMR (10^6 unidades/mL o 1000 veces la concentración microbiana esperada en el ambiente acuoso) o en un mínimo de cinco concentraciones incluyendo la DMR.
- Observaciones y criterios de valoración biológica: Las tasas de crecimiento se calculan sobre la base del número medido de frondas y el peso seco al inicio y al final de la prueba. El aspecto de la planta debe observarse al inicio y al final de la prueba. Las pruebas de infectividad basadas en concentraciones medidas de AMCP en homogeneizados de cuerpo entero de *L. minor* son opcionales.
- Controles: Además de los grupos de control negativo y control de filtrado estéril (opcional), se recomienda encarecidamente un control no infeccioso.
- Una desventaja de este método es la brevedad de la duración de la prueba, ya que los posibles efectos patógenos podrían no manifestarse durante los 7 días de exposición. Extender la duración de la prueba podría ser una solución lógica, pero aumentar el período de exposición requiere un cambio de criterios de validez.

b. Opciones de exención

Se puede presentar una exención:

- Si la exposición de las plantas acuáticas es insignificante o mínima.
- En el caso de que el PMCP no corresponda a un herbicida.
- Si las búsquedas en la base de datos no encuentran informes de impactos perjudiciales en las plantas por los microorganismos considerados y especies relacionadas dentro del mismo género en relación con información suficiente sobre el modo de acción, biología, ciclo de vida y condiciones ambientales para la supervivencia y la reproducción.

3.1.9 Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad oral, inhalatoria y dérmica aguda de PMCPs en mamíferos.

Para realizar la evaluación del PMCP en mamíferos se recomienda realizar el protocolo que se describe en el Reporte EPS 1/RM/44 del Centro de consultas públicas sobre medio ambiente y cambio climático de Canadá.

a. Observaciones y consideraciones del protocolo Reporte EPS 1/RM/44

- Método de prueba: Se basa en los protocolos: "Toxicidad/patogenicidad OPPTS 885.3050 Acute Oral Toxicity/Pathogenicity [EPA 712-C-96-315],9 OPPTS 885.3100 Acute Dermal Toxicity/Pathology [EPA 712-C-96-316],10 OPPTS 885.3150 Acute Pulmonary Toxicity/Pathogenicity [EPA 712-C-96-318].
- Tipo de prueba: prueba de efectos adversos sobre la supervivencia, el comportamiento y la apariencia (examen microscópico de tejidos y órganos) de ratas o ratones expuesto a PMCP por vía oral y/o por inhalación (es decir, mediante instilación intranasal o intratraqueal) y/o dérmica.
- Régimen de dosificación: una sola vez, al inicio de la prueba

Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

- Duración de la prueba: ≥ 21 días para vía oral y por inhalación, 14 días para evaluación dérmica.
- Organismos de prueba: adultos jóvenes de una cepa de laboratorio de ratón o rata; igual número de machos y hembras no embarazadas, de edad y tamaño similar en cada tratamiento; aclimatado a las cámaras de prueba y las condiciones de prueba durante ≥ 7 días antes del inicio de la prueba
- Vía de exposición: por vía oral (por sonda nasogástrica) o por inhalación si se trata de una prueba de concentración única o de una prueba de concentración múltiple. En el caso de la exposición dérmica se les administra una única dosis de PMCP o se realiza una prueba de concentración múltiple en la piel en un periodo de exposición de 24 h.
- Dosis de prueba: Se puede realizar el ensayo en una dosis única que corresponda a 10^8 unidades del AMCP por animal testiado. Se deberá entregar una justificación si se emplea una dosis menor.
- Controles: control negativo y se recomienda el suministro del PMCP inactivado y el control del filtrado estéril del cultivo de crecimiento del AMCP.
- Ensayo de infectividad: Se realiza al final de la prueba y si las técnicas analíticas lo permiten se determina la concentración del AMCP en órganos (por ejemplo, corazón, cerebro, riñón, hígado), tejidos o fluidos corporales (por ejemplo, sangre u orina) de roedores de cada tratamiento.
- Observaciones: Para la evaluación de los ensayos de toxicidad/patogenicidad aguda vía oral e inhalatoria se realizan diariamente la evaluación de la supervivencia, el comportamiento (por ejemplo, letargo, temblores, convulsiones, coma, patrón de sueño atípico) y apariencia (por ejemplo, lesiones externas) de cada organismo de prueba. Los animales que mueren durante la prueba, así como los que sobreviven al final de la prueba, se someten a necropsia; se examinan en busca de evidencia de lesiones y anomalías post mortem (los cambios pueden incluir necrosis de tejidos u órganos, hemorragia, etc.); se seleccionan tejidos para futuros análisis microscópicos si se considere necesario. Para el ensayo de evaluación de toxicidad/patogenicidad dérmica se realizan observaciones y registros semanales de mortalidad, irritación de la piel, peso corporal, comportamiento atípico y, si los efectos tóxicos son evidentes se debe hacer necropsia macroscópica al final de la prueba.
- Validez del ensayo: Inválido si hay una supervivencia menor a un 90% en el control negativo al final de la prueba.

b. Evaluación de la toxicidad y/o patogenicidad oral, inhalatoria y dérmica subcrónica de PMCPs en mamíferos.

Para realizar la evaluación del PMCP en mamíferos se recomienda realizar el protocolo que se describe en el Reporte EPS 1/RM/44 del Centro de consultas públicas sobre medio ambiente y cambio climático de Canada.

c. Consideraciones y/o observaciones del protocolo Reporte EPS 1/RM/44

- Las especies y cepas de animales de prueba que se utilizarán son aquellas en las que se observó infectividad / persistencia inusual del AMCP en los estudios de nivel I de toxicidad / patogenicidad aguda, y en las que no se observaron signos significativos de patogenicidad o toxicidad.
- Método de prueba: Se basa en el protocolo de la "USPEPA OPPTS 885.3600 Subchronic Toxicity/ Pathogenicity" [EPA 712-C-96-232]12 con modificaciones menores.

Protocolos de evaluación toxicológica y patogenicidad de los productos microbianos de control de plagas en organismos no objetivos

- Las consideraciones y/o observaciones son las mismas que las descritas en el ítem 7.3.1.9, con la diferencia que el protocolo se desarrolla en 90 días, administrando la dosis del PMCP diariamente durante ese periodo de tiempo.